

**Züchtung primärer osteogener Zellen auf neuartigen  
Gerüststrukturen in Kleinfermentern zur Herstellung von  
Knochenimplantaten *in vitro***

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr.rer.nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von  
**Marc Barthold**  
aus Goslar

1. Referent: apl. Prof. Dr. R. Wagner  
2. Referentin: Prof. Dr. C. Müller-Goymann  
eingereicht am: 07.04.2003  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 25.06.2003

## Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### *Publikationen*

**Barthold, M.**, Mayer, H., Jäger, V. (2001) Cultivation of primary osteogenic cells in serum-reduced or serum-free culture media: attachment, proliferation and differentiation. In: Animal cell technology: From target to market. Lindner-Olsson, E., Chatzissavidou, N., Lüllau, E. (Hrsg.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande, 581-583.

### *Tagungsbeiträge*

**Barthold, M.**, Mayer, H., Jäger, V. (2000) Attachment and proliferation of primary osteogenic cells in serum-reduced and serum-free culture medium.  
Poster im Rahmen des "Symposium on therapeutic applications of human stem and precursor cells" in Hannover.

**Barthold, M.**, Mayer, H., Jäger, V. (2001) Cultivation of primary osteogenic cells in serum-reduced or serum-free culture media: attachment, proliferation and differentiation.  
Poster im Rahmen der "Second transdisciplinary conference on principles and perspectives in regenerative medicine" in Hannover.

Bertram, H., **Barthold, M.**, Schliephake, H., Lindenmayer, W., Jäger, V., Mayer, H. (2001) Improvement of growth properties and osteogenic potential of human mesenchymal stem cells.  
Vortrag im Rahmen der "Euroconference on: Basic and applied research in skeletal tissue engineering perspectives." in Carnogli (Genua), Italien.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 1999 bis Juli 2002 in der Abteilung Zellkulturtechnik im Bereich Bioverfahrenstechnik der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) im Rahmen zweier von der DFG (MA-852/7-1) und der Europäischen Union (Projekt „Tissue Reactor“) geförderter Projekte durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. Volker Jäger für die interessante Aufgabenstellung, die gute Betreuung und die vielen wertvollen Anregungen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Bei Herrn Prof. Dr. Roland Wagner und Frau Prof. Dr. C. Müller-Goymann möchte ich mich für die Übernahme der Referate und die Vertretung dieser Arbeit vor der Naturwissenschaftlichen Fakultät der TU Braunschweig bedanken.

Herrn Prof. Dr. Hubert Mayer bin ich sehr dankbar für die vielen fruchtbaren Diskussionen, die Bereitstellung des humanen Zellmaterials und die zahlreichen theoretischen und praktischen Hilfen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Manfred Rohde für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen bedanken.

Herrn Claus Zenneck von der Firma Meredos GmbH und Herrn Uwe Klein von der Firma Klein Messgeräte danke ich für die Zusammenarbeit bei der Lösung der Probleme mit der eingesetzten Bioreaktorstation.

Weiterhin möchte ich Frau Xin Lu danken, die im Rahmen ihrer Studienarbeit die Einsetzbarkeit des serumreduzierten Mediums für die Kultur primärer Rattenzellen untersucht hat.

Herrn Dr. Helge Bertram danke ich für die praktische Einführung in die Methodik der RT-PCR, die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und die gute Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Mir Morris Hosseini und Herrn Dr. Lothar Just danke ich für die praktische Einführung in die Arbeiten mit dem Rattenmodell.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Zellkulturtechnik danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt Herrn Carsten Griesel für die freundschaftliche Zusammenarbeit an der Bioreaktorstation. Frau Samira Fargali, Frau Ingrida Majore und Frau Nadia Zghoul danke ich für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen, die die Arbeit bereichert haben.

Mein besonders herzlicher Dank gilt meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben. Für ihr Verständnis und Ihre tägliche Unterstützung möchte ich mich abschließend ganz besonders bei meiner Freundin Viola und unserer Tochter Malin bedanken.

# INHALT

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Funktion und Struktur des Knochens .....</i>	1
1.1.1	Funktion des Knochens .....	1
1.1.2	Struktur des Knochens .....	2
1.2	<i>Knochenbildung.....</i>	4
1.2.1	Osteogene Differenzierung .....	5
1.2.1.1	Die mesenchymale Stammzelle .....	5
1.2.1.2	Differenzierung von Osteoblasten.....	6
1.2.2	Knochenbildung <i>in vivo</i> .....	11
1.2.3	Bildung und Mineralisierung der extrazellulären Knochenmatrix.....	11
1.3	<i>Knochen Tissue Engineering.....</i>	14
1.3.1	Grundlagen des Knochen <i>Tissue Engineering</i> .....	14
1.3.2	Kulturbedingungen für die Zellvermehrung und Differenzierung <i>in vitro</i> ...	17
1.3.2.1	Cytokine .....	17
1.3.2.2	Glucocorticoide und Vitamine .....	21
1.3.3	Trägergerüste und deren Besiedlung .....	23
1.3.4	Kulturführung in dreidimensionalen Trägergerüsten.....	26
1.4	<i>Problemstellung und Zielsetzung .....</i>	28
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>30</b>
2.1	<i>Zellkultur.....</i>	30
2.1.1	Medien, Lösungen und Medienzusätze .....	30
2.1.2	Primärzellkultur und Subkultivierung .....	32
2.1.2.1	Zellisolation und Primärzellkultur von Knochenvorläuferzellen der Ratte	32
2.1.2.2	Subkultivierung .....	33
2.1.2.3	Humanzellen .....	33
2.1.2.4	Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung .....	34
2.1.2.5	Berechnung der Verdopplungszeit .....	34
2.1.3	Kryokonservierung .....	35
2.1.4	Beschichtung von Zellkulturoberflächen.....	36

<i>2.2 Biochemische Analytik</i> .....	38
2.2.1 Alkalische Phosphatase Aktivität .....	38
2.2.1.1 Quantifizierung der membrangebundenen Alkalischen Phosphatase .....	38
2.2.1.2 Quantifizierung der löslichen Alkalischen Phosphatase .....	38
2.2.2 Quantifizierung des extrazellulären Calciums .....	39
2.2.3 Quantifizierung der Lactatdehydrogenase .....	39
2.2.4 Bestimmung des Ammoniumgehalts im Medium .....	40
2.2.5 Bestimmung der Zellvitalität mit WST-1 .....	41
2.2.6 Bestimmung der Zellzahl mit Hoechst 33258 .....	41
2.2.7 Gesamtproteinbestimmung mit BCA .....	42
2.2.8 Quantifizierung von Osteocalcin .....	43
2.2.9 Quantitative Bestimmung von Glucose und L-Lactat .....	44
<i>2.3 Histologische Färbetechniken</i> .....	45
2.3.1 Alkalische Phosphatase Färbung .....	45
2.3.2 Mineralisierungsfärbung nach von Kossa .....	46
2.3.3 Sudan-III Färbung von Adipozyten .....	46
2.3.4 Alcian Blue Färbung .....	46
<i>2.4 Elektronenmikroskopie</i> .....	47
<i>2.5 Nukleinsäureanalytik</i> .....	48
2.5.1 RNA-Isolierung .....	48
2.5.2 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration .....	49
2.5.3 cDNA-Synthese .....	49
2.5.4 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	51
2.5.5 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren .....	52
<i>2.6 Arbeiten mit dem Bioreaktor</i> .....	53
2.6.1 Verwendete Trägermaterialien .....	53
2.6.1.1 Osteofoam .....	53
2.6.1.2 Camceram .....	53
2.6.1.3 Vitoss .....	54
2.6.2 Aufbau des Bioreaktors .....	54
2.6.2.1 Kulturführung mit dem Bioreaktor .....	56
2.6.2.2 Bestimmung der Mischzeitkinetik .....	56
2.6.2.3 Bestimmung des Sauerstoffübergangs .....	57

<b>3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>59</b>
3.1 <i>Standardisierung des Rattenmodells</i>	59
3.1.1 Primärzellisolation und Subkultivierung	59
3.1.2 Zellcharakterisierung	65
3.2 <i>Bestimmung eines geeigneten Kulturmediums</i>	72
3.2.1 Basalmedien	72
3.2.2 Serumeinfluss auf Adhäsion und Proliferation	73
3.2.3 Einfluss von Cytokinen, Hormonen und Vitaminen	76
3.3 <i>Kulturführung auf Trägergerüsten in statischer Kultur</i>	84
3.3.1 Besiedlungsmethode und Besiedlungsdichte	84
3.3.2 Vergleich unterschiedlicher Trägergerüste	90
3.3.3 Vergleich von Proliferation und Differenzierung auf Camceram und Osteofoam in Langzeitkultur	93
3.4 <i>Reaktorversuche</i>	96
3.4.1 Technische Charakterisierung	96
3.4.2 Optimierung der internen Umwälzung	99
3.4.3 Einfluss des Sauerstoffgehaltes	101
3.4.4 Zellverteilung im Trägergerüst	103
3.4.5 Bioreaktorkultur mit kontinuierlichem Mediumwechsel	104
<b>4. ALLGEMEINE DISKUSSION</b>	<b>109</b>
4.1 <i>Isolierung und Charakterisierung von Knochenvorläuferzellen der Ratte</i>	109
4.2 <i>Steuerbarkeit von Zellproliferation und -differenzierung durch das Kulturmedium</i>	113
4.3 <i>Kultivierung von Zellen auf Trägergerüsten</i>	116
4.3.1 Auswahl und Besiedlung des Trägergerüsts	116
4.3.2 Vergleich von Bioreaktor- und statischer Kultur	117
4.4 <i>Zusammenfassung und Ausblick</i>	120
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>122</b>
<b>6. Abkürzungen</b>	<b>131</b>

# 1 Einleitung

Die Behandlung von großen Knochendefekten insbesondere mit Methoden des *Tissue Engineering* setzt detaillierte Kenntnisse des zu heilenden Gewebes voraus. Insbesondere im Falle des Knochens umfasst dies sowohl zelluläre Prozesse als auch Informationen über makroskopische Eigenschaften, so z.B. mechanische Parameter wie Zugfestigkeit und Druckwiderstand.

Im folgenden Abschnitt soll deshalb zunächst auf Funktion und Struktur des Knochens eingegangen werden. Im Weiteren wird die Knochenbildung unter besonderer Beachtung der zellulären Prozesse und der Bestandteile der extrazellulären Matrix vorgestellt. Im dritten Abschnitt sollen dann die speziellen Aspekte des Knochen *Tissue Engineering* erörtert werden.

## 1.1 Funktion und Struktur des Knochens

### 1.1.1 Funktion des Knochens

Das Knochengewebe dient im Organismus drei Hauptaufgaben: der Bewegung, dem Schutz der inneren Organe und als metabolisches Reservoir. Knochen bildet im Verbund mit Knorpel das Skelett des Vertebraten und damit den passiven Bewegungsapparat, der als Anheftungspunkt für die Muskulatur dient. Die Befähigung zu äußerst komplexen Bewegungsabläufen wird durch eine Vielzahl von Knochenformen erreicht. Man unterscheidet drei große Gruppen: die kurzen, die flachen und die langen Knochen. Zu den Röhren- oder langen Knochen gehören z.B. Ober- und Unterschenkelknochen (*Femur und Tibia*), ihr Wachstum erfolgt grundsätzlich in eine Hauptrichtung. Die flachen Knochen dagegen zeigen eine Ausdehnung in zwei Hauptrichtungen, zu ihnen gehört beispielsweise das Schulterblatt. Zu den kurzen Knochen gehört z.B. die Handwurzel. Neben diesen drei großen Gruppen existieren eine Reihe besonders angepasster Knochen wie die lufthaltigen Knochen des Schädels (z.B. Oberkiefer), die mit Luft gefüllte und durch Schleimhaut ausgekleidete Hohlräume enthalten, oder die Sesambeine, die unter anderem wie die Kniescheibe (Patella) in Sehnen eingebaut sein können (Platzer, 1999).

Des Weiteren haben alle Arten von Knochen auch eine Schutzfunktion sowohl für die inneren Organe als auch für das im inneren, trabekulären System des Knochens



befindliche Knochenmark, dem als bedeutendstes Stammzellreservoir des adulten Organismus eine lebenswichtige Funktion zukommt. Sowohl für den Schutz als auch für die Bewegung eignet sich das Knochengewebe besonders gut durch seine mechanische Belastbarkeit. So hat Knochen eine ähnliche Zugfestigkeit wie Gusseisen, ist aber dreimal leichter und hat eine zehnmal höhere Elastizität. Während der dichte Knochen maximale Widerstandskraft gegen Torsions- und Beugekräfte leistet, ermöglicht seine hohe Elastizität das Abfangen von punktuellen Belastungen, die den Knochen über die Gelenke erreichen (Carter et al., 1998; Buckwalter et al., 1996).

Darüber hinaus bildet das mineralisierte Knochengewebe ein wichtiges Reservoir für Ionen, insbesondere Calcium und Phosphat, und leistet damit einen Beitrag zur Aufrechterhaltung des metabolischen Gleichgewichtes. Da Knochen auch im adulten Organismus einem ständigen Umbauprozess unterliegt (s. 1.2), stehen die im Mineralanteil des Knochens enthaltenen Ionen dem Organismus ständig zur Verfügung (Baron, 1996).

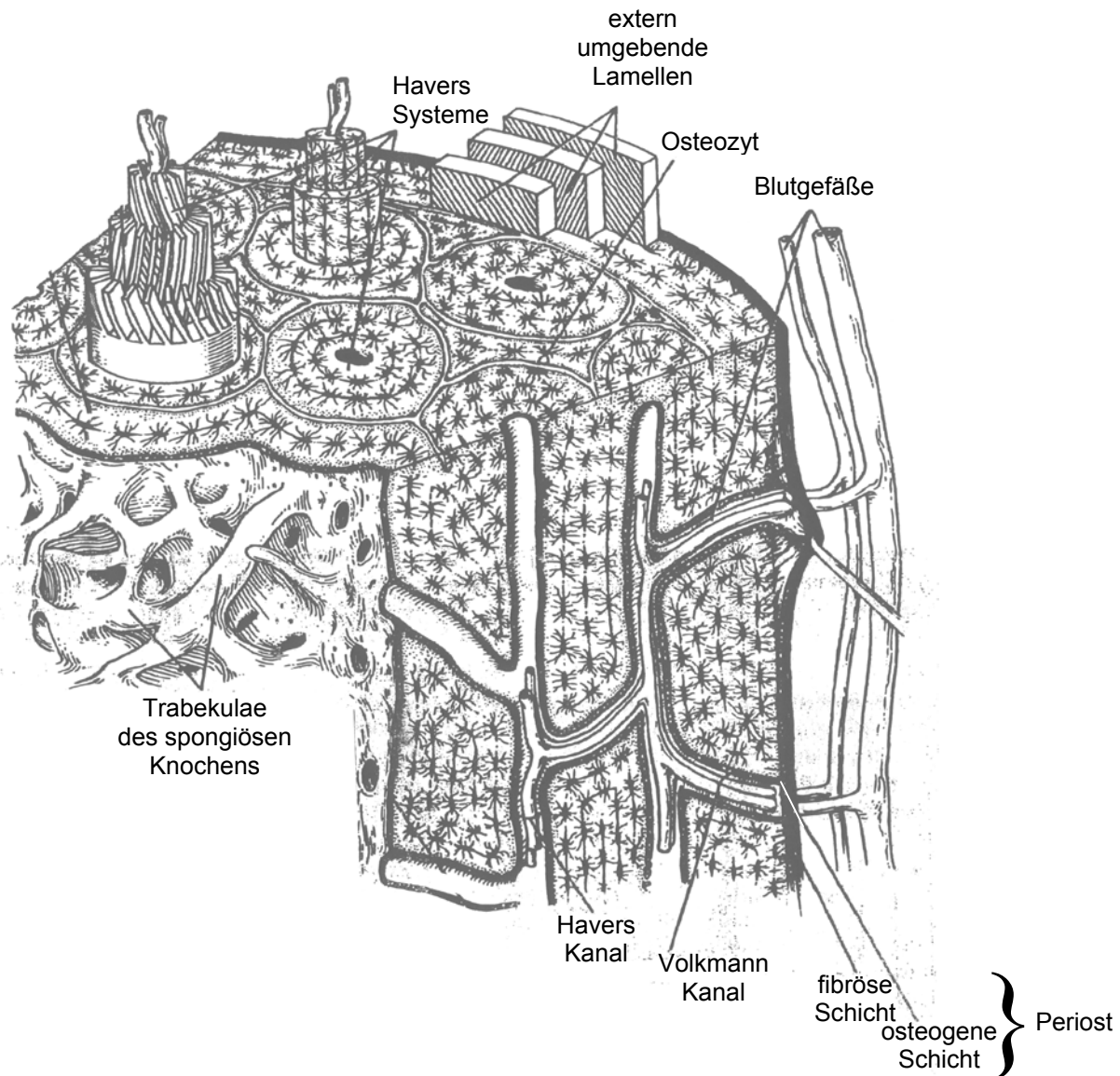
### **1.1.2 Struktur des Knochens**

Alle Arten von Knochen haben im adulten Organismus grundsätzlich denselben Aufbau: im Innern befindet sich das Knochenmark, das vom eigentlichen Knochengewebe umgeben ist, die äußere Schicht bildet das Periost. Letzteres umkleidet den Knochen überall dort, wo sich keine Gelenkflächen befinden. Das Periost besteht aus einer inneren osteogenen und einer äußeren fibrösen Schicht (siehe Abbildung 1.1) und enthält Blut- und Lymphgefäße sowie Nerven. Das Knochenmark besteht anteilig je nach Alter aus hämatopoetischem (rotem) Knochenmark und (gelbem) Fettmark, das mit höherem Alter überwiegt. Sowohl die osteogene Schicht des Periosts als auch das Knochenmark sind Quellen für Zellen, die bei Bedarf in Osteoblasten differenzieren können (s. 1.2).

Das eigentliche Knochengewebe kann beim ausgewachsenen, unversehrten Knochen nach seiner makroskopischen Struktur in zwei Arten unterteilt werden, der trabekuläre oder spongiöse Knochen einerseits und der cortikale oder kompakte Knochen andererseits. 80% des adulten Knochengewebes ist kompakt. Während bei beiden Knochengewebearten Matrixzusammensetzung und mikroskopische Struktur übereinstimmen, sind die Porosität und damit die Dichte von spongiösem und kompaktem Knochen deutlich verschieden. Letzterer weist lediglich eine Porosität

von ca. 10% auf, dagegen zeigt der spongiöse Knochen eine Porosität zwischen 50 und 90%. Diese makroskopischen Unterschiede ziehen weitere funktionelle Unterschiede nach sich. Kompakter Knochen hat pro Volumeneinheit eine bis zu zehnfach höhere Elastizität und Druckfestigkeit als spongiöser Knochen, der wiederum eine zwanzigfach höhere Oberfläche pro Volumeneinheit besitzt. Der kompakte Knochen beginnt direkt unterhalb des Periosts und ist für Stütz- und Schutzfunktionen hervorragend geeignet, wogegen das spongiöse Gewebe im Knocheninnern das Knochenmark umgibt. Hierbei ist ein direkter Kontakt zwischen Zellen des Knochengewebes und des Knochenmarks durch die größtenteils an der Oberfläche der Trabekulae wachsenden Knochenzellen gewährleistet. Im kompakten Knochen dagegen findet man häufiger die klassisch von extrazellulärer Knochenmatrix eingeschlossenen Osteozyten. Die makroskopische Struktur des kompakten Knochen wird von dem sog. Havers-System (*Osteonum*) beherrscht. In diesem sind Schichten von parallel verlaufenden Kollagenfibrillen abwechselnd mit Schichten aus Osteozyten um einen zentralen Gefäßkanal herum angeordnet (s. Abb. 1.1). Die parallel angeordneten spiraligen Kollagenfibrillen werden auch als Lamellen bezeichnet. Die abwechselnde Anordnung von links- und rechtsspiraligen Lamellen in einem Havers-System begründet die außergewöhnliche Zug- und Druckfestigkeit des Knochens. Die Nährstoffversorgung der Zellen über die Gefäße ist gewährleistet, solange ein Abstand der Zellen vom Blutgefäß kleiner 200 µm eingehalten wird. Die Blutgefäßversorgung erfolgt vom Periost her über kleine, schräg verlaufende Kanäle (sog. Volkmannsche Kanäle) (Buckwalter et al., 1996).

Nach Knochenbrüchen und in der Embryonalentwicklung findet man im Unterschied zu dem beschriebenen lamellaren Knochen auch den geflechtartigen (engl. *woven*) Knochen. Dieser ist durch eine amorphe Anordnung der Kollagenfibrillen gekennzeichnet und ähnelt in seinem Aufbau verknöchertem Bindegewebe. Entsprechend kleiner sind Elastizität, Zug- und Druckfestigkeit. Im adulten Organismus findet man diese Knochenart nur noch an wenigen Stellen, unter anderem in den Gehörknochen. Er spielt aber eine zentrale Rolle bei der Knochenbildung als Vorstufe zum lamellaren Knochen (Platzer, 1999).



**Abbildung 1.1:** Struktur von kompaktem, lamellarem Knochengewebe am Beispiel der Diaphyse eines Röhrenknochens. Der kompakte Knochen setzt sich hauptsächlich aus den sog. Havers Systemen zusammen, die um das zentrale Blutgefäß lamellenförmig geschichtete Kollagenfibrillen enthalten. Der innenliegende spongiöse Knochen wird von diesem kompakten Knochen umgeben, der wiederum vom zweischichtigen Periost eingefasst wird. Die Versorgung mit Blutgefäßen erfolgt vom Periost her (modifiziert übernommen aus Buckwalter et al., 1996).

## 1.2 Knochenbildung

Sowohl während der embryonalen Entwicklung als auch nach einem Knochenbruch und im normalen adulten Organismus findet ständig Knochenbildung statt. Der Knochenaufbau erfolgt durch Osteoblasten, die sowohl die charakteristischen Proteine der extrazellulären Knochenmatrix synthetisieren als auch die gebildete Matrix durch Ausscheidung von Calciumphosphaten mineralisieren. Aus den Osteoblasten entwickeln sich zwei weitere Zellarten, die Osteozyten und die *Bone Lining Cells*, die im reifen Knochen für die Aufrechterhaltung der Knochenstruktur

sorgen. Auch der Knochen unterliegt einem ständigen Erneuerungsprozess, 10% der Knochensubstanz eines Erwachsenen werden jedes Jahr neu aufgebaut. Der damit einhergehende ständige Abbau von Knochen erfolgt durch Osteoklasten.

Im Folgenden soll zunächst das Modell der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten beschrieben werden. Diese zelluläre Sichtweise der Osteogenese soll durch einen kurzen Abschnitt über die Knochenbildung *in vivo* ergänzt werden, komplettiert durch die Darstellung der Bildung und Mineralisierung der extrazellulären Knochenmatrix.

## 1.2.1 Osteogene Differenzierung

### 1.2.1.1 Die mesenchymale Stammzelle

Friedenstein zeigte als erster, dass das Knochenmarkstroma neben den bereits bekannten hämatopoetischen Stammzellen auch Zellen der mesenchymalen Linie mit hoher proliferativer Kapazität beherbergt (Friedenstein et al., 1976). Während zunächst durch Implantationsversuche in Diffusionskammern das Potenzial dieser Zellen zur Knochenbildung *in vivo* nachgewiesen wurde, konnte in späteren Versuchen gezeigt werden, dass aus Einzelkolonien (*Colony forming units-fibroblasts*, CFU-F) ebenfalls Knorpel, Fett und fibröses Gewebe *in vivo* und *in vitro* gebildet werden konnte (Bab et al., 1986; Bennett et al., 1991). *In vitro* konnte mit Maus- und Rattenzellen unter entsprechendem Differenzierungsdruck auch die Bildung von Muskel- und Sehnenzellen aus CFU-Fs nachgewiesen werden (Wakitani et al., 1995; Young et al., 1998).

Diese Versuche stützten die These einer im Knochenmarkstroma beheimateten multipotenten mesenchymalen Stammzelle (*Mesenchymal Stem Cell*, MSC) (Prockop, 1997). Der Nachweis dieser einzelnen MSC gestaltete sich nicht zuletzt aufgrund von Schwierigkeiten mit dem klonalen Wachstum dieser multipotenten Zelle ausgesprochen mühsam, so dass erst in den letzten Jahren erste Erfolge bei der Klonierung von nachweisbar multipotenten Zellen erzielt werden konnten (Pittenger et al., 1999).

Dennoch kann die wissenschaftliche Diskussion um den tatsächlichen Umfang des Potenzials der adulten MSCs nicht als beendet angesehen werden. Während das derzeit vorherrschende Modell die Differenzierung der MSCs in Knochen-, Knorpel-, Muskel-, Sehnen-, Knochenmarkstroma- und Fettzellen als gegeben voraussetzt (Caplan & Bruder, 2001), mehren sich ebenfalls Berichte über die Differenzierung von MSCs in Herzmuskel-, Hirn- und Nervenzellen (Makino et al., 1999; Chen et al.,

2001; Woodbury et al., 2000; Kim et al., 2002; Fukuda, 2002, Liechty et al., 2000, Kopen et al., 1999). Demnach hat eine mesenchymale Stammzelle nicht nur die Potenz, unter geeigneten Bedingungen in alle Zellen des mesenchymalen Systems zu differenzieren, sondern zeigt darüber hinaus eine keimblattübergreifende Pluripotenz, wenn sie *in vivo* oder *in vitro* in die entsprechende Umgebung gebracht wird. Sollten sich diese Erkenntnisse der letzten drei Jahre bestätigen, rücken sie die adulten mesenchymalen Stammzellen in der Abschätzung ihres therapeutischen Nutzens in die unmittelbare Nähe der rechtlich und ethisch problematischeren embryonalen Stammzellen.

#### 1.2.1.2 Differenzierung von Osteoblasten

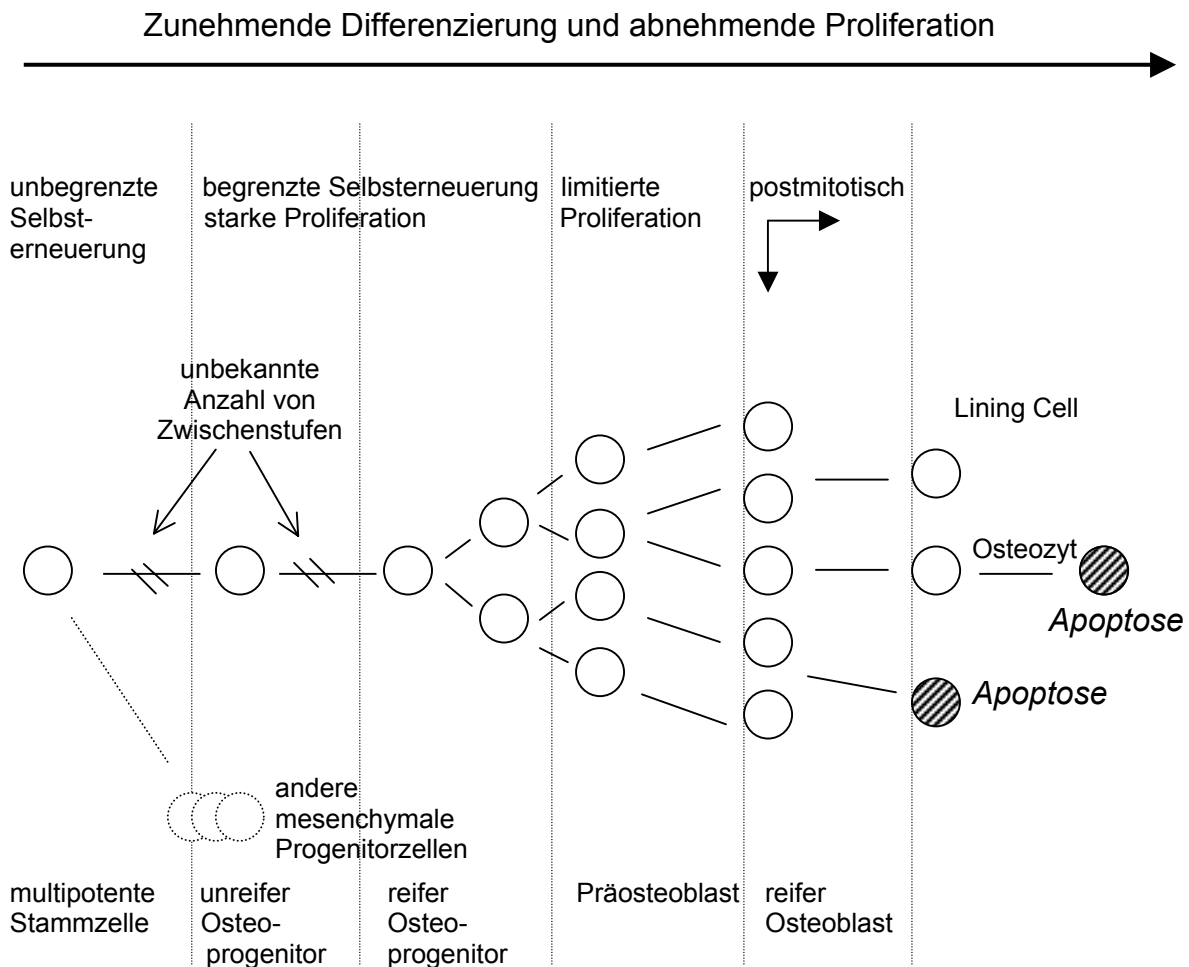
Die Bildung der drei Knochen aufbauenden Zellen - Osteoblasten, Osteozyten und *Bone Lining Cells* - aus deren Vorläufern erfolgt im Körper sowohl während der embryonalen Knochenbildung als auch während Wachstum, Knochenumbau und der Knochenneubildung nach einer Fraktur. Im adulten Organismus existieren mehrere Reservoirs für Osteoblastenvorläufer, die im Falle einer erforderlichen Neubildung von Knochen bis ins hohe Alter aktiviert werden können. Eines der potentesten Reservoirs bildet dabei das Knochenmark (Friedenstein et al., 1976). Als weitere Quellen für osteogene Zellen werden die osteogene Schicht des Periosts, Fettgewebe aber auch peripheres und Nabelschnurblut genannt (Platzer, 1999; Zuk et al. 2001; Mareshi et. al., 2001; Chesney et al., 2000).

Seit der ersten Veröffentlichung von Owen und Stein, 1990, ist das zunächst grobe Schema der reziproken Kopplung von Proliferation und Differenzierung (Owen et al., 1990) während der Osteogenese aus multipotenten Vorläufern immer weiter verfeinert worden. Unter der reziproken Kopplung von Proliferation und Differenzierung versteht man den gleichzeitigen Rückgang des mitogenen Potenzials mit fortschreitender Differenzierung der Zelle. Die osteogene Differenzierung wird dabei trotz ihres kontinuierlichen Verlaufs in definierte Zellstadien unterteilt. Ausgehend von der mesenchymalen Stammzelle verläuft die Osteogenese weiter über folgende Differenzierungsstadien: unreifer Osteoprogenitor, reifer Osteoprogenitor, Präosteoblast und Osteoblast. MSCs sind *per definitionem* zur unbegrenzten Selbsterneuerung befähigt. Sobald die Zelle aber das Stadium des Osteoprogenitors erreicht, büßt sie diese Eigenschaft ein. In dieser Entwicklungsphase sind die Zellen allerdings noch zu einer intensiven Proliferation

befähigt, während sie als Präosteoblasten nur noch begrenzt teilungsfähig sind und diese Eigenschaften als ausdifferenzierter Osteoblast ganz verloren haben (s. Abb. 1.3; Aubin & Liu, 1996). Abgesehen von der Teilungsfähigkeit gleicht der Präosteoblast dem reifen Osteoblasten sowohl im Expressionsmuster der Matrixproteine als auch hinsichtlich der Alkalischen Phosphatase.

Anhand von morphologischen und histochemischen Untersuchungen, die durch *in situ* Proliferationsversuche ergänzt wurden, unterscheidet man im entwickelten Knochen drei Stufen von knochenaufbauenden Zellen: den Osteoblasten, den Osteozyten und die *Bone Lining Cell*. *In vivo* sind Osteoblasten an den Stellen der aktiven Matrixbildung an der Knochenoberfläche zu finden und sowohl morphologisch durch ihre kubische Form als auch durch ihre hohe Alkalische Phosphatase Expression gekennzeichnet. Darüber hinaus synthetisiert ein Osteoblast die gängigen Knochenmatrixproteine (s. Tab. 1.1. und Kap. 1.2.3). Der Präosteoblast ist im Bereich der Matrixsynthese ein oder zwei Zellschichten entfernt von den terminal differenzierten Osteoblasten lokalisiert.

Es wird geschätzt, dass ca. 10-20% der Osteoblasten in die extrazelluläre Matrix eingebettet werden und sich so zum Osteozyten weiterentwickeln. Die gesamte Proteinsynthese, so auch die Expression der Alkalischen Phosphatase, ist in dieser abschließenden Stufe der Osteogenese vermindert, da ihm nur noch eine homöostatische Funktion zukommt. Die flachen, länglichen *Bone Lining Cells* bedecken fast die gesamte Knochenoberfläche, die nicht umgebaut wird. Ihr metabolischer Status ähnelt dem Osteozyten. Der Großteil (~65%) der Osteoblasten unterliegen allerdings nach Beendigung der Knochenmatrixsynthese der Apoptose (Manolagas, 2000).



**Abbildung 1.2:** Postulierte Schritte der osteogenen Differenzierung unter Annahme von erkennbaren Zwischenstufen auf dem Weg von einer multipotenten mesenchymalen Stammzelle zu den abschließenden Differenzierungsstufen des Osteoblasten, Osteozyten und der *Bone Lining Cell*. (adaptiert aus Aubin, 1999).

**Tabelle 1.1:** Zusammenstellung der wichtigsten für die Osteogenese charakteristischen Marker: BSP = Bone Sialoprotein, Koll-I = Kollagen I, AP = Alkalische Phosphatase, OPN = Osteopontin, ON = Osteonectin, OCN = Osteocalcin, c-myc und c-fos = Proto-Oncogene, Cbfa-1 = knochenspezifischer Transkriptionsfaktor (adaptiert/ergänzt aus Aubin, 1999).

	MSC	unreifer Osteoprogenitor	reifer Osteoprogenitor	Preosteoblast	Osteoblast	Osteozyt
Marker für osteogene Differenzierung	Stro-1 (hum.) Sca-1 (hum.)	transient BSP, c-myc, c-fos, Cbfa1/Osf2	Koll-I, AP, OPN, ON,	Koll-1, AP, OPN, ON, BSP	Koll-I, AP, OPN, ON, BSP, OCN	OPN, ON, OCN, BSP

Bei der Analyse der osteogenen Differenzierung werden die bereits erwähnten histochemischen und morphologischen Beobachtungen durch Untersuchungen auf Protein-, RNA- und DNA-Level ergänzt. Die Erstellung eines Differenzierungsprofils

aus biochemisch und molekularbiologisch detektierbaren Markern hat sich aufgrund der Heterogenität der untersuchten Kulturen als schwierig erwiesen. Dies gilt gleichermaßen für die häufig verwendeten Primärkulturen aus Calvarien und Knochenmark der Ratte sowie z.B. für die osteogene Mauszelllinie MC3T3-E1. Trotz häufig widersprüchlicher Ergebnisse hat sich im Laufe der Zeit ein grundlegendes Muster des Auftretens von Matrixproteinen, Zelloberflächenproteinen, Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren und Oncogenen im Laufe der osteogenen Differenzierung als zuverlässig und weitgehend speziesübergreifend ergeben (s. Tab 1.1; Aubin, 1999). Eines der am besten akzeptierten Merkmale für die fortschreitende Differenzierung von Knochenvorläuferzellen zu Osteoblasten ist die ansteigende spezifische Aktivität der nicht-gewebespezifischen Alkalischen Phosphatase (Rodan et al., 1988), obwohl die Rolle dieses Enzyms in der Knochenbildung noch nicht abschließend geklärt ist. Einerseits deuten pathologische Hinweise darauf hin, dass die Alkalische Phosphatase (AP) eine Rolle in der Knochenmineralisierung inne hat. Beispielsweise leiden Patienten mit einer Hypophosphatasie, einer erblichen AP-Defizienz, unter einer schwachen Knochenmineralisierung (Whyte, 1989). Andererseits gehört die AP auch zu einer Gruppe von Zelloberflächenproteinen, die über einen Phosphatidylinositol (PI)-Anker an die Plasmamembran gebunden sind. Diese Proteine können durch PI-spezifische Phospholipasen abgespalten werden. Ihnen wird eine Rolle bei der transmembranen Signalübertragung zugesprochen. Dabei könnte die AP eine Rolle in der Migration und Differenzierung von Knochenvorläuferzellen spielen (MacGregor et al., 1995). Dieser Ansatz würde eine Begründung für die sehr frühe Expression von AP bereits in Knochenvorläuferzellen liefern.

Die Matrixproteine, deren proteinchemische Eigenschaften und Funktionen an anderer Stelle vorgestellt werden (s. 1.2.3), dienen ebenfalls als Markerproteine für die Bestimmung des Differenzierungsstadiums der Zelle. Kollagen I, als grundlegendes Protein der Knochenmatrix, kann sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene bereits bei der reifen Knochenvorläuferzelle nachgewiesen werden und ist mit immunhistochemischen Methoden auch noch beim postmitotischen Osteoblasten nachweisbar (s. Tab. 1.1).

Die Nichtkollagenproteine (*Non-Collagenous-Proteins*, NCPs) werden erst zu einem späteren Zeitpunkt der Differenzierung synthetisiert. Ihr Einbau in die extrazelluläre Matrix (Extracellular Matrix, ECM) erfolgt mit der Reifung der Knochenmatrix. Eine



Ausnahme bildet die transiente Expression des Bone Sialoproteins (BSP) in frühen Knochenvorläuferzellen, dessen Rolle für die Matrixreifung allerdings noch nicht geklärt ist. Danach ist eine deutlich verminderte Transkription dieses Matrixproteins festzustellen, die allerdings bei den Präosteoblasten erneut nach oben reguliert wird. Osteozyten zeigen wieder eine verminderte BSP-Expression. Die Synthese der Matrixproteine Osteopontin (OPN) und Osteonectin (ON) erfolgt direkt nach Beginn der Kollagenbildung. Ihr Expressionsprofil bleibt bis zur Differenzierungsphase des Osteozyten hoch. Osteocalcin (OC) ist der späteste Proteinmarker für die osteogene Differenzierung. Seine Synthese erfolgt erst zeitnah zur beginnenden Mineralisierung der gereiften extrazellulären Matrix und ist charakteristisch für den abschließenden Schritt der osteogenen Differenzierung.

Die Oberflächenmarker Stro-1 und Sca-1, die beide nur bei humanen Zellen auftreten, charakterisieren die besonders interessante Differenzierungsphase der sehr frühen, multipotenten Vorläuferzellen. Ebenfalls in einer frühen Phase der osteogenen Differenzierung, noch vor der Expression von Kollagen I, sind die Proto-Oncogene c-myc und c-fos auf Transkriptionsebene nachweisbar. Ihnen werden Schlüsselrollen als Transkriptionsfaktoren zugesprochen (Grigoriadis et al., 1996).

Neben den bisher vorgestellten Differenzierungsmarkern, die während der Osteogenese exprimiert werden, existiert eine Reihe von lokalen und systemischen Hormonen und Cytokinen, deren Einfluss auf die osteogenen Zellen je nach Stadium unterschiedlich sein kann. Obwohl gerade bei dem Nachweis der rezeptorvermittelten Wirkung dieser Faktoren vornehmlich das besser zu kontrollierende *in vitro* System zum Einsatz kommt, findet man in der Literatur große Unterschiede in der Wirksamkeit desselben Cytokins oder Hormons. Dies hängt mitunter mit der verwendeten Analyse-methode, dem eingesetzten Zellmodell (Zelllinie vs. primäre Zelle) oder der untersuchten Spezies zusammen. Es spielen allerdings auch Expositionszeitpunkt und -dauer sowie das Vorhandensein synergistischer Faktoren eine große Rolle bei ihrer Wirksamkeit (Aubin, 1999). Die Verwendung von Cytokin- oder Hormonresponsivität bei einer nicht-klonalen Zellpopulation *in vitro* als Marker für das Differenzierungsstadium ist daher auf dem jetzigen Wissensstand als ausgesprochen kritisch zu bewerten. Die proteinchemischen Eigenschaften sowie allgemeine Wirkprinzipien der in dieser Arbeit verwendeten Cytokine und Hormone sind in Kapitel 1.3.2 zusammengefasst.

### **1.2.2 Knochenbildung *in vivo***

Sowohl die embryonale als auch die Knochenbildung nach einer Fraktur folgen grundsätzlich demselben Schema: zunächst wird fibröser/geflechtartiger (primärer) Knochen gebildet, der dann sukzessive durch lamellaren (sekundären) Knochen ersetzt wird. Im Vergleich zu lamellarem Knochen weist der fibröse Knochen ein noch irreguläres Muster der Kollagen I Fibrillen auf, er hat darüber hinaus einen weitaus höheren Umsatz von Proteinen der extrazellulären Matrix und einen bis zu vierfach höheren Anteil an Osteozyten. Durch die ebenfalls irreguläre Mineralisierung sowie einen höheren Zell- und Wasseranteil des primären Knochens ist dieser zwar deutlich flexibler aber auch deutlich weniger mechanisch belastbar als lamellarer Knochen (s. 1.1.2).

Bei der embryonalen Knochenbildung unterscheidet man zwei Arten: die intramembranöse (direkte) und die endochondrale (indirekte). Bei der intramembranösen Knochenbildung differenzieren die mesenchymalen Vorläuferzellen direkt zu Osteoblasten (s. 1.2.1), die dann den primären Knochen aufbauen. Diese Art der Knochenbildung ist hauptsächlich den Gesichts- und Hüftknochen vorbehalten. Die embryonale Bildung der Röhrenknochen verläuft über endochondrale Ossifikation, während derer die mesenchymalen Stammzellen zunächst in Chondrozyten differenzieren. Diese bauen Knorpelgewebe auf, dass dem späteren Knochen in Form und Position gleicht. Die primäre Mineralisierung erfolgt dann durch hypertrophe Chondrozyten. Der mineralisierte Knorpel wird in der Folge von einwandernden Osteoblasten als Matrix zur Bildung des subchondralen Knochens genutzt (Hunziger, 1994).

Der Aufbau des primären Knochengewebes nach einem Bruch geht entweder von der osteogenen Schicht des Periosts oder dem Knochenmark (s. 1.1.2) aus. Hier sind proliferationsfähige Osteoblastenvorläufer beheimatet, die zu Osteoblasten differenzieren, eine extrazelluläre Knochenmatrix aufbauen und diese mineralisieren können. Hierbei bildet der geflechtartige Knochen immer eine Vorstufe des kompakten, lamellaren Knochens (Marks & Hermey, 1996).

### **1.2.3 Bildung und Mineralisierung der extrazellulären Knochenmatrix**

Man teilt die Entstehung der mineralisierten Knochenmatrix in drei Phasen ein: Matrixbildung, Matrixreifung und Mineralisierung. Die Bildung der extrazellulären Matrix beginnt mit der Synthese von Kollagen I durch reife Osteoprogenitorzellen.

Kollagen I macht zugleich mit ca. 90-95% den überwiegenden Anteil der organischen Knochenmatrix aus. Die verbleibenden Nichtkollagenproteine (Non-Collagenous Proteins, NCP) gehören zu den Sialo-Glycoproteinen, Phosphoproteinen,  $\gamma$ -Carboxyglutaminsäure-beinhaltende Proteinen oder Proteoglycanen (Butler, 1987). Osteocalcin, Bone Sialoprotein, Osteopontin und Osteonectin sind die wichtigsten NCPs der Knochenmatrix.

Kollagen I kommt eine herausragende Bedeutung für die mechanischen Eigenschaften des Knochens zu (s. 1.1.2). Die Basis hierfür bildet die charakteristische „coiled-coil“-Tripelhelixstruktur der Kollagene, die die spiralförmige Form der Fibrillen bedingt. Der hohe Anteil der kleinsten Aminosäure Glycin ermöglicht diese außergewöhnliche Tertiärstruktur. Nur solche Mitglieder der Kollagenfamilie, die eine durchgängige Helixstruktur haben, bilden Fibrillen aus. Neben Kollagen I gehören dazu auch das im Knorpel vorherrschende Kollagen II, sowie die Kollagene III, V und XI (Peterkowsky et al., 1995).

Osteocalcin ist mit einer molekularen Masse von 5.800 Dalton ein vergleichsweise kleines Matrixprotein. Es gehört zu der Gruppe der  $\gamma$ -Carboxyglutaminsäure (Gla)-beinhaltenden Proteine und wird daher auch als BGP (Bone Gla Protein) bezeichnet (Price et al., 1976). Osteocalcin wird eine Rolle bei der Regulation des Wachstums der Hydroxylapatitkristalle zugesprochen (Heinegard & Oldberg, 1989). Im Vergleich zu den anderen NCPs wird Osteocalcin erst zu einem späten Zeitpunkt der Matrixreifung mit Beginn der Mineralisierung synthetisiert. Die Expression von Osteocalcin wird *in vivo* und *in vitro* durch  $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> stimuliert und durch den Knochentranskriptionsfaktor Cbfa1/Osf2 reguliert (Rodan, 1997).

Bone Sialoprotein (BSP) findet man ausschließlich im Knochengewebe. Das sialinsäurereiche Phosphoprotein hat eine molekulare Masse von 59.000 Dalton.  $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> inhibiert die Bildung von BSP, während das Hormon Dexamethason sie stimuliert (Oldberg et al., 1988). Die Funktion von BSP ist nicht abschließend geklärt, ihm wird allerdings eine Rolle in der anabolen Phase des Knochenumbaus (*bone remodeling*) zugesprochen. Über eine R-G-D- (Arg-Gly-Asp)-Bindungsstelle in seiner Aminosäuresequenz kann das Protein über Integrinrezeptoren an Zellen binden. Darüber hinaus wurde die Bindungsfähigkeit des Proteins an Hydroxylapatit nachgewiesen (Heinegard and Oldberg, 1989).

Osteonectin hat eine molekulare Masse von 33.000 Dalton. Es ist ein in vielen Geweben verbreitetes NCP, das unter anderem *in vitro* auch von Chondrozyten

produziert wird. Osteonectin ist identisch mit SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein) und BM-40. Seine Funktion ist nicht endgültig geklärt. Es weist allerdings in seiner Aminosäuresequenz neben einer Häufung calciumbindender Glutaminsäurereste auch eine EF-Hand auf. Dabei handelt es sich um ein häufig auftretendes Motiv calciumbindender Proteine aus zwei Peptidketten (E-Peptid, F-Peptid), die die Calciumbindung an das Gesamtprotein vermitteln. Im Knochen erscheint daher eine Funktion in der Mineralisierung wahrscheinlich, auch wenn das Protein bereits zu einer sehr frühen Phase der Matrixreifung exprimiert wird (Bolander et al., 1988; Domenicucci et. al., 1988).

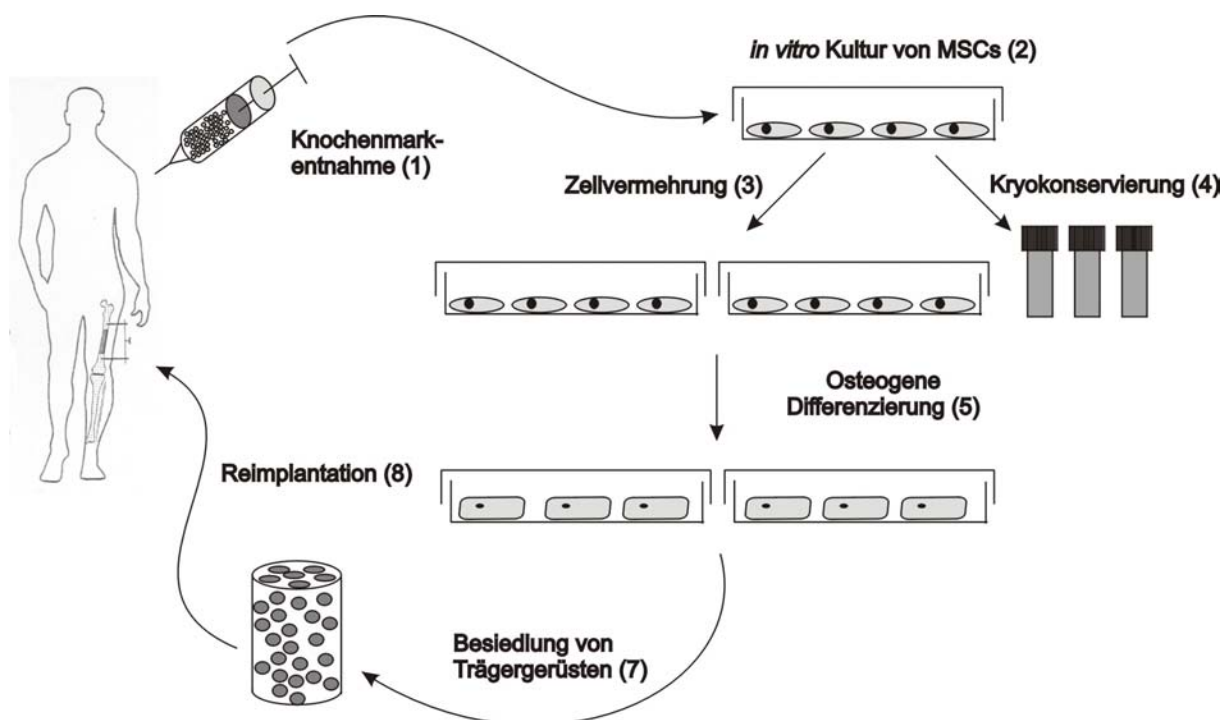
Osteopontin (2ar) ist ein Phosphoprotein mit einer molekularen Masse von 32.600 Dalton. Die Struktur des sialinsäurereichen Proteins ähnelt der von BSP. Im Gegensatz zu BSP wird die Synthese von Osteopontin allerdings durch  $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> stimuliert (Oldberg et al., 1986). Osteopontin wird bereits während des frühen Reifungsprozesses der ECM durch reife Osteoprogenitoren exprimiert. Ihm wird eine potenzielle Funktion als Bindungsstelle für Osteoklastenvorläufer im Rahmen des *bone remodeling* zugesprochen. Dies wird durch die Tatsache gestützt, dass es in einem Bereich des Knochens nachgewiesen werden konnte, in dem die Präosteoklasten an den Knochen binden und zu reifen Osteoklasten verschmelzen (Heinegard & Oldberg, 1989).

Die genannten NCPs wie auch Kollagen I erfüllen nicht nur als Grundsubstanz der ECM eine Gerüstfunktion. Die ECM dient des Weiteren als wichtiges Reservoir für Cytokine (s. 1.3.2.1) und andere lokale Faktoren. Darüber hinaus beeinflussen die Matrixproteine auch direkt über Zelloberflächenrezeptoren, wie Syndecane oder die bereits genannten Integrine, die Genexpression der Zellen. Gemeinsam und z.T. synergistisch mit anderen exogenen Faktoren, wie Hormonen, Cytokinen oder Zell-Zell-Interaktionen, beeinflusst die ECM so Wachstum, Differenzierungsstadium und Metabolismus der Zellen (Juliano & Haskill, 1993). Da auf diese Weise wiederum die Zusammensetzung der Matrixkomponenten reguliert wird, spricht man von einem geschlossenen Regelkreis oder „*mutual reciprocity*“ (Haralson & Hassel, 1995). Beispielsweise wurde nachgewiesen, dass Kollagenfibrillen über einen integrinvermittelten Signalweg zur Stimulation des Transkriptionsfaktors Cbfa1/Osf2 beitragen, der wiederum eine entscheidende Rolle in der Osteocalcin-Expression spielt (Xiao et al., 1998).

Der abschließende Schritt der Matrixbildung ist die Mineralisierung, die Einlagerung von Calciumphosphat und Calciumcarbonat in die gereifte extrazelluläre Matrix. Der anorganische Hauptbestandteil ist das Calciumphosphat Hydroxylapatit ( $\{Ca[Ca_3(PO_4)_2]_3\}^{2+} \cdot 2 OH^-$ ). *In vitro* beginnt dieser Vorgang zumeist in Form von „nodules“ (engl. Knötchen) an verschiedenen Punkten der Kultur.

### 1.3 Knochen Tissue Engineering

#### 1.3.1 Grundlagen des Knochen Tissue Engineering



**Abbildung 1.3:** Grundprinzip des Knochen Tissue Engineering. Dem Patienten wird Knochenmark entnommen (1). Die darin enthaltenen MSCs werden *in vitro* selektiert und vermehrt (2,3) und durch osteogene Kulturbedingungen gerichtet differenziert (5). Die Kryokonservierung der primären Stellung ermöglicht die Wiederholung der Kulturschritte. Nach Besiedlung eines geeigneten Trägergerüsts erfolgt die autologe Reimplantation an den Ort des nicht selbstständig heilenden Knochendefektes (entnommen und modifiziert aus Caplan & Bruder, 1997).

Knochen ist das einzige Gewebe des Körpers, das sich ohne Narbenbildung regenerieren kann. Durch Unfall oder Tumorentfernungen können allerdings Knochendefekte auftreten, die so groß sind, dass die körpereigene Regenerationsfähigkeit nicht ausreicht, um eine solche Lücke zu schließen. Man spricht in diesem Fall von einem Defekt kritischer Größe (Critical Sized Defect, CSD). Bei einem Röhrenknochen überschreitet die Länge eines solchen Defektes den doppelten Knochendurchmesser. Für diese großen Knochenläsionen sowie für kleinere schwer heilende Knochendefekte bietet das Knochen Tissue Engineering

eine potenzielle Verbesserung zu bestehenden klinischen Therapien. Neben dem Einsatz von Metall-, Keramik- oder Kunststoffimplantaten gilt die autologe Transplantation von Knochen aus dem Beckenkamm als Methode der Wahl. Die erfolgreichen Ergebnisse mit dieser Operationsmethode werden durch die Probleme eines doppelten Eingriffs und damit einer zusätzlichen Schwächung des Patienten relativiert. Die sehr positiven Ergebnisse des Einsatzes von autologem Knochen werden auf die Transplantation eines lebenden Gewebes inklusive Zellen und extrazellulärer Matrix zurückgeführt und genau an diesem Ansatz orientiert sich das *Tissue Engineering* (Williams, 1999). Tatsächlich stellt das Auffüllen eines Knochendefektes mit einem permanenten, non-degradablen Implantat aus beispielsweise Titan einen deutlichen Bruch in der Kontinuität des Knochens dar. Hierbei bestehen zwei Hauptprobleme. Erstens ist auch bei maximaler chemischer Inertheit des Materials eine Wechselwirkung mit dem umliegenden Gewebe unumgänglich. Zweitens kann das Material gerade wegen seiner Inertheit nicht vollständig mit dem umliegenden Knochengewebe verwachsen, was Probleme mechanischer Natur gerade an den Kontaktstellen nach sich zieht. Kein Implantatmaterial vereinigt den Belastungen so angepasste mechanische Parameter wie das Knochengewebe selbst (Buckwalter et al., 1996). Eine verbesserte Kontinuität an der Verbindungsstelle soll durch den Einsatz von osteokondutiven Implantatmaterialien, die die Wechselwirkung und z.T. auch das Einwandern von umliegendem Knochengewebe in das Implantat anregen sollen (Hench, 1998), erreicht werden. Man unterscheidet drei Ansätzen zur Therapie von großen Knochendefekten, die Osteoinduktion, die Osteokonduktion und das *Tissue Engineering*. Es gibt Biomaterialien, die bei mesenchymalen Stammzellen des umliegenden Gewebes eine osteogene Differenzierung induzieren. Die Osteoinduktion solcher Materialien, für die xenogene oder allogene, demineralisierte Knochenmatrix das beste Beispiel darstellt, führt zu einem verbesserten Einbau des zu verwendenden Implantats. Einen weiterentwickelten Ansatz stellt die Osteokonduktion dar. Hierbei wird nicht nur die Bildung von Knochenzellen induziert, sondern die Einwanderung der Knochenzellen durch die Materialeigenschaften gefördert. Das *Tissue Engineering* beinhaltet sowohl dieses Konzept als auch die selbstständige Gewebebildung des verwendeten Implantates durch eine *ex vivo* Besiedlung mit Knochenvorläuferzellen (s. 1.3.3).

Wie kann nun das in Abbildung 1.3 dargestellte Konzept eine Alternative zu der Verwendung von biokompatiblen Materialien oder auch allogener oder xenogener Transplantation darstellen? Die Vorteile des Einsatzes von autologen Zellen für die Herstellung eines Implantats liegen auf der Hand: die Risiken einer Infektion oder einer immunologischen Reaktion auf das Implantat sind gering und die Wirksamkeit der durch die Zellen gebildeten Matrixproteine und Cytokine auf das umliegende Gewebe ist deutlich besser als beim Einsatz xenogener Transplantate. Die *ex vivo* Vermehrung von autologen Zellen beinhaltet natürlich eine problematische zeitliche Komponente. Anders als bei dem *Tissue Engineering* von lebensnotwendigen Organen wie Herz oder Leber, kann allerdings bei großen Knochendefekten aufgrund der ohnehin langwierigen Rekonvaleszenz von vielen Monaten eine gewisse Therapiedauer auch bei akuten Fällen in Kauf genommen werden. Darüber hinaus handelt es sich bei einem Großteil der zu behandelnden Fälle um planbare Operationen mit einer gewissen Vorlaufzeit.

Nach der Knochenmarkentnahme erfolgt *in vitro* die selektive Vermehrung der osteogenen Population des Knochenmarks. Dies kann durch immunologische Positiv- oder Negativ-Sortierung mittels Oberflächenmarkern (Stro-1, Sca-1) erfolgen oder im einfacheren Fall durch differentielle Adhäsion nach Friedenstein (Friedenstein, 1976). Es folgt eine Phase intensiver Zellvermehrung, bei der die Zellen mehrfach subkultiviert werden müssen. Eine Einflussnahme erfolgt hier zumeist über Medienkomponenten (s. 1.3.2). Auch die gesteuerte Differenzierung kann mit den entsprechenden Supplementen erreicht werden. Die Ansätze zur Besiedlung eines geeigneten Trägergerüsts sind vielfältig (s.1.3.3). Je nach Kultivierungstechnik und Gerüstgröße kann die Besiedlung vor oder nach der Zellvermehrung stattfinden. Wünschenswert wäre eine frühe Besiedlung des Trägermaterials und eine möglichst lange Kultivierung der Zellen im Träger vor der Implantation, um ein möglichst einheitliches Komposit aus Zellen, extrazellulärer Matrix und Trägermaterial zu erreichen. Aufgrund der Kultivierungsbedingungen kann es dabei allerdings auch zu nekrotischen Bereichen im Trägergerüst kommen (Ishaug-Riley et al., 1998, Shea et al., 2000).

### 1.3.2 Kulturbedingungen für die Zellvermehrung und Differenzierung *in vitro*

Zur Stimulation von Proliferation und Differenzierung *in vitro* sind eine Reihe potenter Agenzien - Cytokine, Hormone und Vitamine – bekannt, die auch *in vivo* als lokale und systemische Faktoren Knochenwachstum und Knochenheilung fördern (Mundy et al., 2001). Einige von ihnen sind essenziell für die Kultur von osteogenen Zellen, andere bieten die Möglichkeit, Proliferation und/oder Differenzierung gezielt zu steuern. Die folgende Aufstellung gibt einen Einblick in die wichtigsten Supplemente der osteogenen Zellkultur. Neben den nachstehend ausführlich behandelten gibt es eine Vielzahl von weiteren Faktoren, die bei der Knochenzellentwicklung *in vivo* oder *in vitro* bereits auf ihre Anwendbarkeit z.T. sehr detailliert untersucht wurden (GM-SCF, BMPs). Genauer sollen hier allerdings nur diejenigen Faktoren beschrieben werden, die in der vorliegenden Arbeit auch zum Einsatz gekommen sind.

#### 1.3.2.1 Cytokine

##### *Fibroblast Growth Factor*

Fibroblast Growth Factor (FGF) -1 und -2, welche auch als saures und basisches FGF bezeichnet werden, sind Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 17.000 Dalton (Burgess & Marciag, 1989). Ursprünglich wurden diese beiden Faktoren aus dem Nervensystem isoliert, mittlerweile konnte allerdings gezeigt werden, dass sie in einer Vielzahl von normalen und erkrankten Geweben, einschließlich des Knochens, synthetisiert werden [Globus et al., 1989]. FGFs sind Mitglieder einer Familie von mindestens neun verwandten Genen. Sie besitzen angiogene Eigenschaften und werden als wichtige Bestandteile des Ablaufs der Neovaskularisierung und der Wundheilung angesehen. FGF-1 und FGF-2 stimulieren die Proliferation von Knochenvorläuferzellen, die in der Lage sind, Kollagen zu synthetisieren (Canalis et al., 1988), wobei die Wirksamkeit von FGF-2 die der anderen Mitglieder weit übertrifft. Bei differenzierten Osteoblasten zeigt FGF-2 allerdings eine inhibitorische Wirkung auf die Kollagen-Synthese (Hurley et al., 1993) und steigert die Expression von Matrixmetalloproteasen, was *in vivo* zu einem erhöhten Kollagenabbau führt. Eine systemische Behandlung mit FGF-2 ruft einen frühen Anstieg der Anzahl an Präosteoblasten hervor, welcher gefolgt wird von einer Rekrutierung von Osteoblasten mit einem nachfolgenden Anstieg der Knochenbildung (Nakamura et al., 1995). FGFs binden an Proteoglycane der extrazellulären Matrix. Es ist



anzunehmen, dass dies eine Veränderung der Wirksamkeit des Proteins nach sich zieht. Der stimulatorische Einfluss von FGFs sowohl bei der Neovaskularisierung als auch auf die Knochenzellreplikation, legt nahe, dass ihnen eine wichtige Rolle im Prozess der Knochenregeneration zukommt.

Es gibt vier verwandte FGF-Rezeptorgene, welche als FGFR-1 bis -4 bezeichnet werden (Wang et al., 1994). Aus Studien an Zelllinien weiß man, dass die FGF-Rezeptoren 1-3 diejenigen intrazellulären Signaltransduktionswege aktivieren, die zu einer erhöhten Mitose der Zellen führen. Eine Reihe von skeletalen Abnormalitäten sind mit Mutationen in diesen Rezeptorgenen verknüpft. Diese Abnormalitäten variieren in Abhängigkeit vom betroffenen Rezeptor. Eine Mutation in FGFR-3 verursacht beispielsweise Achondroplasie, die häufigste Ursache für Zwergwuchs (Shiang et al., 1994).

#### *Platelet derived Growth Factor*

Der anfänglich aus roten Blutplättchen isolierte *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) ist ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa, dem eine wichtige Rolle in der frühen Phase der Wundheilung zugesprochen wird (Helding & Westermarck, 1987). Normale und neoplastische Gewebe synthetisieren ebenfalls PDGF, was darauf hinweist, dass er ebenfalls als systemischer Regulator des Gewebewachstums eine Rolle spielt. PDGF ist ein Dimer, bestehend aus den Monomeren PDGF-A und PDGF-B, was die Bildung von zwei Homodimeren und einem Heterodimer möglich macht. PDGF-AB und -BB sind die vorherrschenden Formen, die auch im Blutstrom vorkommen. In seiner Wirkungsweise ist PDGF der des FGF ähnlich. Es stimuliert die Zellreplikation und als Konsequenz dessen steigert es die Anzahl der knochenbildenden Zellen und damit auch die Matrixsynthese. Jedoch ist bisher kein direkter Einfluss von PDGF auf differenzierte Osteoblasten nachgewiesen, allerdings konnte allgemein eine verminderte Knochenmatrixbildung durch Zugabe von PDGF *in vitro* gezeigt werden (Hock & Canalis, 1994). Es existieren keine spezifischen Bindeproteine für PDGF, jedoch ist bekannt, dass PDGF-B Ketten an Osteonectin binden, welches die Aktivität des PDGF vermindert (Raines et al., 1992).

Die Wirkung von PDGF wird über die Bindung an die beiden existierenden PDGF-Rezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  reguliert. Das höchste stimulatorische Potenzial der drei Dimere besitzt PDGF-BB, dessen Wirkung von beiden Rezeptoren vermittelt wird. Die

anderen beiden Dimere binden dagegen lediglich an den  $\alpha$ -Rezeptor. (Centrella et al., 1992).

PDGF-BB stimuliert ebenfalls die Knochenresorption durch Beeinflussung der Replikation von Osteoklastenvorläufern. Darüber hinaus induziert es die Expression von Matrixmetalloproteasen bei Osteoblasten. Die Synthese des lokal produzierten PDGFs wird über Wachstumsfaktoren reguliert (Rydziel et al., 1994). Die PDGF-A Expression lässt sich über TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor*  $\beta$ ) und PDGF, nicht jedoch über systemische Hormone, regulieren. Die PDGF-B Expression wird ebenfalls über TGF- $\beta$  reguliert.

### *Insulin-like Growth Factor und Insulin*

Das 5.800 Dalton schwere Polypeptidhormon Insulin hat eine Ausnahmestellung unter den anabol wirksamen Hormonen im Stoffwechsel inne. Seine Einflussnahme auf die Osteogenese ist eng mit der Wirkung zweier ebenfalls mit einem hohen Wirkungsspektrum ausgestatteten Cytokinen, *Insulin-like Growth Factor* -I und -II (IGF-I und II), verknüpft. Die beiden anabol wirkenden Polypeptide haben eine Molekularmasse von ca. 7.500 Dalton. Sowohl ihre partielle Strukturhomologie mit Insulin als auch die Homologie ihrer Rezeptoren mit dem Insulinrezeptor verursachen eine ähnliche Wirkungsweise wie Insulin.

Wie andere Bindegewebszellen auch, besitzen Osteoblasten und deren Vorläufer Rezeptoren sowohl für Insulin als auch für IGFs und exprimieren auch das für die Signalvermittlung von IGFs notwendige zellassozierte IGF-*binding protein* (IGFBP). Es gibt zwei IGF-Rezeptoren: der Typ I Rezeptor wirkt über eine Tyrosin-Kinase-Kaskade, seine Bindungsaffinität sinkt in der Reihe IGF-I > IGF-II > Insulin. Der Typ II Rezeptor ist ein Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, der die Wirkung von Insulin nicht vermitteln kann.

Knochenzellen produzieren selbst IGF und lagern es in der ECM ein. Während human Osteoblasten hauptsächlich IGF-II produzieren, überwiegt bei Osteoblasten der Ratte die Produktion von IGF-I (Conover, 1996). Die Expression von IGF durch Osteoblasten wird durch eine Vielzahl von Hormonen reguliert. Bei primären Rattenzellen reduzieren Glucocorticoide wie Dexamethason die Synthese von IGF-I. Dieses wird von  $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> wieder rückgängig gemacht (Chen et al., 1991). Die auf RNA-Level nachgewiesene IGF-Expression ist in reifen

Osteoblasten am höchsten aber in Osteozyten, *Bone Lining Cells* und Knochenmarkszellen nicht vorhanden (Middleton et al., 1995).

IGFs wie auch Insulin wirken stimulierend auf die Knochenmatrixsynthese der Osteoblasten und deren Vorläuferzellen. Bei Abbau der extrazellulären Matrix werden die eingelagerten IGFs freigesetzt und regulieren die Matrixproduktion der reifen Osteoblasten nach oben. Systemische Verabreichung von IGFs führt auch *in vivo* zu einer erhöhten Knochenbildung (Osteoarthritis) (Dequeker et al., 1993). Ein altersabhängig verringerter IGF-Anteil in der extrazellulären Matrix führt zu einer verminderten Knochendichte (Osteoporose) (Nicolas et al., 1994).

### *Epidermal Growth Factor*

Der epidermale Wachstumsfaktor EGF ist ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von ca. 6.000 Dalton. Die Wirkung dieser Cytokine wird über einen EGF-Rezeptor vermittelt, der sich sowohl auf Osteoblasten und deren Vorläufer als auch auf Osteoklasten findet. *In vivo* hat EGF daher sowohl stimulierende Wirkung auf die Knochenbildung als auch auf die Knochenresorption. *In vitro* konnte nachgewiesen werden, dass EGF bei Knochenvorläuferzellen, wie bei vielen anderen Zellen, zu einer erhöhten Proliferation führt. Die Synthese von Kollagen und Alkalischer Phosphatase wird durch EGF allerdings reduziert (Canalis & Raisz, 1979). Die Mineralisierung wird je nach Expositionsdauer unterschiedlich beeinflusst. Kurzzeitbehandlung (4-48h) mit EGF führt zu einer Stimulation der *Nodule*-Bildung, wohingegen die langfristige Präsenz von EGF (über 4 Tage) zu einer Reduzierung der *Nodule*-Anzahl führt (Antosz et al., 1987). Grundsätzlich kann man demnach sagen, dass EGF die Proliferation positiv und die Differenzierung von Osteoblasten negativ beeinflusst. Stärker noch als bei den zuvor beschriebenen Cytokinen ist die Wirksamkeit von EGF abhängig von der Expositionszeit und der Cytokinkonzentration (Yoneda, 1996).

### *Transforming Growth Factor- $\beta$*

Die Mitglieder der TGF- $\beta$  Familie haben ein Molekulargewicht von ca. 25.000 Dalton. Im Knochen treten drei Formen mit ähnlicher biologischer Funktion auf: TGF- $\beta$ -1, -2 und -3 (Canalis et al., 1993). TGF- $\beta$  wirkt in mehrfacher Weise auf die Knochenbildung. Einerseits stimuliert es die Replikation von frühen Knochenvorläuferzellen und erhöht so die Anzahl der zur Matrixsynthese befähigten

Zellen. Andererseits erhöht TGF- $\beta$  auch direkt die Syntheserate bestimmter Matrixproteine, darunter Kollagen I (Centrella et al., 1987). Die mitogene Wirkung von TGF- $\beta$  wird vor allem auf die Stimulation der Synthese von Wachstumsfaktoren wie PDGF zurückgeführt. *In vivo* vermindert TGF- $\beta$  die Knochenresorption durch Einflussnahme auf die Osteoklastenapoptose (Pfeilschifter et al. 1988). Da Mitglieder der TGF- $\beta$ -Familie ebenfalls chondrogene Wirkung haben, ist bei ihrem Einsatz als Zellkultursupplemente *in vitro* insbesondere der Expositionszeitpunkt von entscheidender Bedeutung.

### 1.3.2.2 Glucocorticoide und Vitamine

#### *Dexamethason*

Die Glucocorticoide, deren bekanntester Vertreter das Cortisol (Hydrocortison) ist, gehören zu den Steroidhormonen. Das für den Knochen wichtigste Glucocorticoidhormon ist Dexamethason (9-Fluor-16 $\alpha$ -methylprednisolon). Seine Rolle als differenzierungsförderndes Agens in der Kultur von primären Knochenzellen ist weitgehend akzeptiert. Dabei muss betont werden, dass die Zugabe von Dexamethason zum Kulturmedium förderlich für die osteogene Differenzierung von Knochenvorläuferzellen ist, nicht jedoch eine grundlegende Voraussetzung. Dexamethason wirkt dabei vor allem steuernd auf die ganz frühen Knochenvorläuferzellen, die noch nicht endgültig auf die osteogene Differenzierung festgelegt sind (Aubin, 1999). Die Wirkung von Dexamethason auf Knochenzellen und deren Vorläufer wird dabei vermittelt durch einen Glucocorticoid-Rezeptor (Giguere et al., 1986). Es wirkt dabei sowohl direkt auf die Expression von knochenspezifischen Proteinen wie Alkalischer Phosphatase, Kollagen I und BSP als auch indirekt über die Einflussnahme auf die Expression von Cytokinen wie IGF-I (s. 1.3.2.1).

#### *1 $\alpha$ ,25-Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub>*

Das in der Niere produzierte 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> (1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) ist die aktivste Endstufe von Vitamin D<sub>3</sub>, einem systemischer Faktor, dessen Rezeptoren in fast allen Geweben verbreitet sind. Chemisch gehört 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> zu der den Steroiden nahestehenden Gruppe der Calciferole. Die Rotationsfreiheit der 6,7 C-C-Einfachbindung erlaubt eine große Konformationsbandbreite. Es sind drei Arten von Rezeptoren bekannt, die die Wirkung des endokrinen 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vermitteln. Der

*nuclear* Vitamin D<sub>3</sub>-Rezeptor (nVDR), der *membrane* Vitamin D<sub>3</sub>-Rezeptor (mVDR) und das Plasma Transport Bindungsprotein (DBP). Alle drei binden optimal an verschiedene Konformationen des 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Die rezeptorvermittelte Wirkung kann sowohl über die Genexpression (nVDR) verlaufen als auch über eine schnellere Kaskade, die z.B. zur Öffnung von Calciumkanälen in der Zellmembran (mVDR) führt (Norman & Collins, 1996).

Die exakte Wirkung von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> auf den Mineralhaushalt wird noch untersucht. Rezeptoren für 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> findet man auf Knochenvorläuferzellen und reifen Osteoblasten, nicht jedoch auf Osteoklasten. Dennoch nimmt das Vitamin sowohl Einfluss auf die Matrixbildung und Mineralisierung als auch auf den Matrixumbau. Bei Letzterem wird vermutet, dass die Einflussnahme indirekt über von Osteoblasten synthetisierte Faktoren wie Osteopontin erfolgt, dessen Syntheserate unter 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Einfluss erhöht ist (Oldberg, 1986). Dem Knochenmatrixprotein Osteopontin wird neben seiner Funktion als Bindungsstelle für Osteoklastenvorläufer auch eine Funktion in der Matrixmineralisierung zugesprochen (s.1.2.3). Desgleichen ist eine stimulierende Wirkung von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> auf die Osteocalcinsynthese nachgewiesen, die durch den Transkriptionsfaktor Cbfa1/Osf2 vermittelt wird (Price & Baukol, 1980; Rodan, 1997). Auch die Synthese von Cytokinen wie IGF-I wird durch 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in Wechselwirkung mit anderen Hormonen wie Dexamethason reguliert.

### *L-Ascorbat*

L-Ascorbat (Vitamin C) oder sein in Nährmedium stabileres Derivat L-Ascorbat-2-Phosphat sind für die Kollagen-Synthese essenzielle Agenzien. Dabei wird ihre Wirkung als Kofaktor der Peptidylhydroxylase ausgenutzt. Hydroxyprolin ist von grundlegender Bedeutung für die Stabilität der Kollagentripelhelixstruktur (Jimenez et al., 1973). Eine Konzentration von 50  $\mu$ g/ml (0,2 mM) im Medium reicht aus, um eine maximale Kollagenbildung bei Knochenzellkulturen zu erzielen. Sekundäre Effekte der Kollagenmatrixbildung sind ein erhöhter Level der Alkalischen Phosphatase und mit einer entsprechenden Zeitverzögerung auch von Osteocalcin (Quarles et al., 1992). Des Weiteren wird der Einfluss von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> durch die Zugabe von L-Ascorbat verstärkt (Franceschi & Young, 1990). Während in Chondrozyten auch eine erhöhte Synthese von Glycosaminoglycanen nachgewiesen werden konnte, scheint dieser Effekt in der Kultur primärer Knochenzellen nicht aufzutreten (Wright et al.,

1988; Spindler et al., 1989). Neben den stimulierenden Effekten auf die Matrixsynthese konnte auch ein proliferativer Effekt von L-Ascorbat bei der osteogenen Mauszelllinie MC3T3-E1 und primären fötalen Knochenzellen der Ratte nachgewiesen werden (Havada et al., 1991; Spindler et al., 1989).

Wie einleitend bereits erwähnt, lässt sich die Liste möglicher Supplemente für die Knochenzellkultur beliebig erweitern. Hier sind auf der Seite der differenzierungsfördernden Agenzien insbesondere die Mitglieder der *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs) zu nennen. Als besonders potente Mitglieder dieser Untergruppe der TGF- $\beta$ -Familie gelten dabei BMP-2, -4 und -7. Darüber hinaus verbessert die Zugabe von  $\beta$ -Glycerophosphat als Phosphatquelle die Mineralisierung der extrazellulären Matrix *in vitro*. Obwohl die Synthese der Matrixproteine wie auch die Proliferation der Knochenzellen nicht beeinflusst werden, konnte bei Zugabe von 10 mM  $\beta$ -Glycerophosphat eine erhöhte Assoziation von Osteocalcin an das extrazelluläre Hydroxylapatit nachgewiesen werden. In Langzeitkulturen von fötalen Rattencalvarienzellen wurde allerdings ebenfalls ein Rückgang der Alkalischen Phosphatase- und Kollagen I-Synthese gezeigt (Stein et al., 1990).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die genannten Faktoren einerseits eine Sammlung sehr aussichtsreicher Kandidaten für eine Steuerung der Proliferation und Differenzierung *in vitro* darstellen. Andererseits zeigen viele Faktoren je nach Expositionszeitpunkt und -dauer vielschichtige Effekte auf Knochenzellen. Die noch nicht ausreichenden Erkenntnisse über die gegenseitige Beeinflussung der Einzelfaktoren, insbesondere bei Mischkulturen, verhindern dabei eine sichere theoretische Vorhersage der Wirkungsweise einer Faktorenkombination *in vitro*.

### 1.3.3 Trägergerüste und deren Besiedlung

Eine zentrale Rolle bei der Therapie von großen Knochendefekten mit Methoden des *Tissue Engineering* kommt dem verwendeten Trägergerüst zu. Die Eignung des Trägers hängt dabei sowohl von den chemischen und physikalischen Materialeigenschaften als auch von der Gerüstgeometrie ab. Beide Aspekte sind Gegenstand aktueller Forschung. Hinsichtlich der geometrischen Daten spielen Porosität, Porengröße und -struktur und die nutzbare Oberfläche eine wichtige Rolle. Diese Parameter sind z.T. materialabhängig. Eine interkonnektierende Porenstruktur

hat sich allerdings allgemein als notwendige Grundvoraussetzung für das Trägergerüst etabliert (Davies, 1999). Dabei sollten die interkonnektiven Kanäle die Migration von Zellen erlauben. Da eine Zelle in Suspension eine Größe von ca. 10 µm hat, muss der Durchmesser deutlich oberhalb dieser Untergrenze liegen. Sowohl bei biodegradablen als auch bei nicht resorbierbaren Materialien wird eine maximale Porosität des Gerüsts unter Erhalt der mechanischen Stabilität angestrebt. Hier können z.T. Unterschiede zwischen den brüchigeren Keramiken und den elastischeren Polymeren auftreten. Die Porosität liegt zumeist jedoch über 90%. Bei der Porengröße findet man derzeit verschiedene Ansätze in der Literatur. Während manche Veröffentlichungen darauf hinweisen, dass kleinere Porendurchmesser von nur 80-100 µm bei Calciumphosphaten und bei synthetischen Polymeren zwischen 200 und 400 µm für den Knocheneinwuchs optimal geeignet sind (Temenoff et al., 1999; Holmes et al., 1986), wird von anderer Seite darauf hingewiesen, dass ein größerer Durchmesser die Versorgung der Zellen im Innern größerer Gerüste begünstigt. Die Porendurchmesser können in diesem Fall zwischen 800 und 1000 µm liegen (Holy et al., 1999).

Die verwendeten bioaktiven Materialien lassen sich in sechs Gruppen einteilen: Hydroxylapatit, resorbierbare Calciumphosphate, Bioglas, abbaubare synthetische Polymere, abbaubare Biopolymere und Komposite aus Calciumphosphaten und synthetischen Polymeren (Williams, 1999).

Die derzeit am weitesten verbreiteten Trägergerüste gehören zu der Gruppe der Calciumphosphate oder zur Gruppe der abbaubaren synthetischen Polymere. Auch auf dem Gebiet der abbaubaren Biopolymere und der Komposite gibt es in jüngster Zeit einige Entwicklungen.

Calciumphosphatträger bestehen aus  $\beta$ -Tricalciumphosphat oder aus Hydroxylapatit. Beide sind der mineralischen Knochensubstanz sehr ähnlich und zeigen deswegen besonders gute Biokompatibilität und Osteokonduktivität. Ihre Einsetzbarkeit wurde sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt (Hott et al., 1997; Goshima et al., 1991). Die hydrothermal aus Korallen gewonnenen Calciumcarbonat-Träger, die die typische Korallenstruktur aufweisen, wurden ebenfalls mit Erfolg in verschiedenen *in vivo* Studien mit und ohne Besiedlung von Zellen verwendet (Petite et al., 2000). Ein Nachteil der rein keramischen Gerüste ist ihre große Brüchigkeit, wodurch sowohl eine Implantation in vornehmlich Kompressionsdruck ausgesetzten Knochen als auch die Handhabung *ex vivo* erschwert wird (Mueller & Glowacki, 1999).

Bei den synthetischen Polymeren herrschen die Poly-L-Lactide (*Poly-L-Lactid Acid*, PLLA), Polyglycolide (*Polyglycolide Acid*, PGA) und deren Copolymer (Poly-L-Lactid-Glycolid Acid, PLGA) vor. Im Gegensatz zum häufig als Knochenzement verwendeten Polymethylmethacrylat (PMMA) sind diese biologisch in ihre Monomere degradierbar und von der FDA bereits für verschiedene klinische Anwendung zugelassen. Die durch die Zusammensetzung des Copolymers bedingte Steuerbarkeit ihrer Abbaurate lässt hierbei die PLGA-Variante als die vielversprechendste erscheinen. In verschiedenen *in vivo* und *in vitro* Studien konnte einerseits ihre Degradierbarkeit und Osteokonduktivität gezeigt werden (Holy et al., 1999, Thomson et al., 1999). Andererseits zeigte sich aber auch, dass die Abbaubarkeit *in vivo* weit schwerer vorhersagbar ist als erwartet und dass trotz vieler Biokompatibilitätstests Entzündungsreaktionen nicht ausgeschlossen werden können (Bostman et al., 1992).

Das Ziel der Herstellung von Kompositen aus synthetischen Polymeren und Calciumphosphaten ist, die Nachteile der Einzelmaterialien zu minimieren und die Vorteile noch weiter zu erhöhen. So kommt ein Komposit aus einem elastischen Polymer und einer brüchigen Calciumphosphatkomponente den mechanischen Eigenschaften des Knochens deutlich näher als jede Komponente für sich genommen (Bonfield, 1988). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass die Akzeptanz der Kompositmaterialien durch die Zellen *in vitro* teilweise besser ist als die der Einzelkomponenten. So konnte eine verbesserte Zelladhäsion von MC3T3-E1 an ein Hydroxylapatit-PLGA-Komposit (50:50) als an Hydroxylapatit allein nachgewiesen werden (Elgendy et al., 1993). Verschiedene Herstellungsmöglichkeiten, Kombinationen und Verhältnisse von Komponenten sind nach wie vor Gegenstand aktueller Forschung (Laurencin & Lu, 1999; Thomson et al., 1998).

Zu den abbaubaren Biopolymeren gehören Materialien wie Kollagen, Fibrin und Hyaluronsäure. Gerüste aus Kollagen I haben einige Vorteile für die Anwendungen des *Tissue Engineering*, dazu gehört ihre hohe Affinität zu adhärent wachsenden Zellen der mesenchymalen Linie. Das Gerüst kann dabei nicht als inertes Material angesehen werden, da Kollagen selbst Einfluss auf die Differenzierung der Zellen nimmt (vgl. 1.2.3). Bedingt durch die Herstellungsverfahren ist eine netzartige Struktur bei den Kollagengerüsten vorherrschend. Definierte Porengrößen und eine interkonnektierende Struktur sind bei Kollagengerüsten nicht zu finden. Darüber hinaus weisen Kollagengerüste für viele Anwendungen keine ausreichende



Druckfestigkeit auf (Mueller et al., 1999; Mueller & Glowacki, 1999). Einen veränderten Ansatz der Knochenheilung verfolgt die Kultur von mesenchymalen Vorläuferzellen auf Hyaluronsäureträgern wie Hyaff-11. Diese haben als Polymer antiangiogene und chondroinduktive Eigenschaften, während die oligomeren Abbauprodukte die Vaskularisierung stimulieren. Das Prinzip der Knochenheilung besteht dabei in der avaskularen Bildung einer Knorpelmatrix, die dann in einem Prozess, der der endochondralen Knochenbildung ähnelt, durch vaskularisierten Knochen ersetzt wird. Dieser interessante Ansatz folgt damit mehr dem Reparaturablauf bei kleineren Knochenbrüchen *in vivo*, was durch die genannten Eigenschaften der Hyaluronsäure und ihrer Abbauprodukte gezielt unterstützt wird (Caplan, 1999; Greco et al., 1998).

Die Besiedlung der Trägermaterialien ist ein entscheidender Schritt im Ablauf der *ex vivo*-Generierung von Knochenimplantaten. Beim Einsatz von autologen Zellen ist dabei gleichermaßen eine maximale Besiedlungseffizienz und eine homogene Besiedlung des Trägergerüsts entscheidend. Des Weiteren ist die Dauer der Kultivierung der Zellen auf den Trägern ein entscheidender Aspekt für die Qualität der zu generierenden Implantate. Bei Trägergerüsten, die direkt vor Implantation besiedelt werden, unterstützen die Zellen durch die von ihnen gebildeten Proteinfaktoren vor allem den osteokonduktiven Charakter des Trägermaterials. Bei *in vivo* Experimenten konnten so vor allem verbesserte Ergebnisse bei der Verbindung des Implantats zum umliegenden Gewebe durch beschleunigten Knocheneinwuchs erzielt werden (Petite et al., 2000). Eine längere *in vitro* Kulturdauer der Zellen auf größeren Gerüsten ( $>0,5 \text{ cm}^3$ ) birgt je nach Kulturführung die Gefahr großer nekrotischer oder zellfreier Bereiche im Innern des Trägers (Ishaug et al., 1997). Dennoch bietet eine ausgedehntere Kultur mit Proliferations- und Differenzierungsphase der Zellen im Trägergerüst eine Vielzahl von Verbesserungen. Neben einer Erhöhung der implantierbaren Zellkonzentration könnte ein solches Implantat auch weitgehend mit knochenspezifischer ECM, inklusive der darin enthaltenen Cytokine, beschichtet sein. Die Verbesserung der Kulturbedingungen osteogener Zellen ist daher Gegenstand aktueller Forschung.

### 1.3.4 Kulturführung in dreidimensionalen Trägergerüsten

Die so genannte statische Kulturführung, bei der besiedelte Trägergerüste in konischen Röhrchen, Petrischalen oder Multiwellplatten ohne jegliche Agitation des Nährmediums kultiviert werden, erzeugt Nährstofflimitationen im Innern der Gerüste. In der Konsequenz erfolgt eine Zellmigration an die Gerüstoberfläche und die Ausbildung nekrotischer Bereiche im Gerüstinnern. Bei Langzeitkulturen können *in vitro* auf den Trägeroberflächen bis zu einer Tiefe von 300 µm knochenähnliche Strukturen mit z.T. in mineralisierte Matrix eingebetteten Osteozyten histologisch nachgewiesen werden. Das Trägerinnere ist dagegen nach einer Kulturdauer von über 72h weitgehend zellfrei (Ishaug-Riley et al., 1998, Arnold et al., 2002).

Neben klassischen Methoden zur bewegten Kultur von Trägern in Medium wie dem Einsatz von Rollerflaschen (Goldstein et al., 1999) und Spinnerkulturen (Shea et al., 2000) wird derzeit vor allem die von Davies et al. entwickelte Methode der „dynamischen Kulturführung“ (Baksh & Davies, 1999) zur Langzeitkultur von Knochenzellen auf Trägergerüsten verwendet. Dabei wird ein Trägergerüst in der Mitte eines konischen 50ml-Röhrchens befestigt. Die Durchströmung des porösen Trägers wird durch exzentrische Drehung des zu zwei Drittel mit Medium gefüllten Röhrchens erreicht. Die genannten Methoden zeigen in unterschiedlichem Ausmaß Verbesserungen hinsichtlich der Nährstoffversorgung der Zellen im Innern voluminöser Träger. Bei der Kulturführung in Rollerflaschen wurde kein positiver Effekt hinsichtlich der Gesamtzellausbeute und Differenzierung gegenüber der statischen Kultur festgestellt. Auch in den Spinnerkulturen konnten nur unwesentlich größere Schichtdicken an der Trägeroberfläche versorgt werden. Die Proliferationsrate der sehr gut wachsenden MC3T3-E1-Zellen wurde zudem schon zu Beginn der maximal zwölfwöchigen Kultur auf den PLGA-Trägern stark gebremst. Im Fall der dynamischen Kulturführung nach Davies wurde bei PLGA-Trägergerüsten mit einer interkonnektiven Struktur eine weitgehende Besiedlung des Trägerinneren berichtet. Darüber hinaus stellen die Autoren eine erhöhte Bildung von Knochenmatrix an der Trägeroberfläche im Vergleich zur statischen Kultur fest. Dies wird auf den mechanischen Stimulus der osteogenen Zellen durch die dynamische Kulturführung zurückgeführt (Wilkes & Athanasiou, 1996).

## **1.4 Problemstellung und Zielsetzung**

Wie viele andere Organ- und Gewebezüchtungen auch, hat das Knochen *Tissue Engineering* in den letzten 5-10 Jahren eine rasante Entwicklung durchlaufen. Heute wird es weitgehend als denkbare Alternative zu gängigen Therapieformen für große Knochendefekte akzeptiert. Dies liegt auch daran, dass die derzeitigen Therapien sehr aufwendig und langwierig sind. Klinikaufenthalte von sechs Monaten sind je nach Ort und Größe des Defektes keine Seltenheit. Darüber hinaus sind die derzeitig klinisch eingesetzten Implantatmaterialien von ihrer mechanischen Stabilität her mit vitalem Knochen nicht zu vergleichen. Trotz ihrer Biokompatibilität sind sie des Weiteren immer wieder Ausgangspunkt von Entzündungen, die häufig mit einer Dislokation des Implantats einhergehen. Der Einsatz von autologer Spongiosa ist nur in wenigen Fällen möglich und belastet den Patienten durch eine weitere Knochenentnahme zusätzlich. Gleichzeitig steigt die Zahl der zu behandelnden Fälle weltweit an. Dies liegt einerseits an dem zunehmenden Durchschnittsalter der Bevölkerung und andererseits an den verbesserten Therapieformen für Knochentumorpatienten.

Aufgrund des geplanten klinischen Einsatzes und des großen Einflusses des umliegenden Gewebes bei einer Implantation, findet man eine große Zahl von Publikationen mit Daten, die in Tiermodellen erzielt worden sind. Dabei wurden sowohl subkutane und intramuskuläre Implantationsorte als auch die Implantation in einen gesetzten Knochendefekt kritischer Größe bei Ratte, Schaf und Hund gewählt (Bruder et al., 1998; Petite et al., 2000). Bei vielen dieser *in vivo* Versuche werden die Kultivierungsphasen der Knochenvorläuferzellen auf den Trägermaterialien *in vitro* bewusst kurz gehalten, da wie bereits erwähnt lange Kultivierungsphasen zu nekrotischen Bereichen innerhalb des Trägers führen können. Das hat den Nachteil, dass man praktisch keine analytischen Daten über die Implantate *in vitro* gewinnen kann. Neben den Vorteilen eines verbesserten Implantates selbst, könnte die verlässliche Überwachung seiner *in vitro* Herstellung eine ausschlaggebende Komponente für die erfolgreiche Durchführbarkeit von klinischen Versuchen sein.

Im Vordergrund dieser Arbeit soll daher die Verbesserung und Standardisierung der Kulturbedingungen sowie die Analyse von Proliferation und Differenzierung von Knochenvorläuferzellen auf Trägermaterialien *in vitro* stehen:

- Grundlegende Charakterisierung des Proliferations- und Differenzierungsverhaltens einer primären Zelle am Beispiel der osteogenen Fraktion des Knochenmarks der Ratte.
- Untersuchung der Auswirkung von verschiedenen Cytokinen auf die Proliferation und Differenzierung von osteogenen Zellen zur Herstellung eines definierten Mediums für die Vermehrung und Differenzierung von Knochenvorläuferzellen *in vitro*.
- Entwicklung und Überprüfung eines geeigneten Kultivierungsprozesses für die Langzeitkultur von osteogenen Zellen auf dreidimensionalen Trägergerüsten unter Einsatz eines bestehenden Kleinfertersystems.
- Etablierung von aussagekräftigen nicht-invasiven Analysemethoden, die eine Überwachung des Kultivierungsprozesses von osteogenen Zellen auf Trägergerüsten ohne Beeinträchtigung der 3D-Kultur erlauben.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Medien, Lösungen und Medienzusätze

Alle Lösungen, Medien und Medienzusätze, die bei den molekularbiologischen Arbeiten oder in der Zellkultur verwendet wurden, wurden mit hochreinem Wasser (Milli-Q-Wasser-Filtrationssystem, Millipore, Eschborn) angesetzt und vor Gebrauch entweder durch Autoklavieren oder bei thermolabilen Lösungen durch Filtration (0,1-0,22 µm) sterilisiert. Glasmaterialien und mehrfach zu verwendende Geräte, wie Präparationsbesteck sowie Kunststoffgefäße und Kunststoffmaterialien (Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, etc.) wurden im Autoklaven sterilisiert (30 min, 121°C, 1 bar).

Als Basalmedien wurden IMDM (Flüssigmedium, Sigma, St.Louis, MO, USA), RPMI-1640 (Flüssigmedium, Sigma), MEM alpha (Pulvermedium, Invitrogen, Karlsruhe), McCoy's 5a (Flüssigmedium, Sigma), DMEM *high glucose* (Pulvermedium, Invitrogen, 4,5 g/l D-Glucose), DMEM *low glucose* (Pulvermedium, Invitrogen, 1 g/l D-Glucose) und ZKT-I (Pulvermedium, Biochrom, Berlin) eingesetzt. ZKT-I wurde in der Abteilung Zellkulturtechnik der GBF entwickelt und von der Firma Biochrom in der vorgegebenen Formulierung gefertigt. Bei der Entwicklung der Zusammensetzung von ZKT-I, wurde ausgehend von einer 1:1 Mischung von Ham's F12 und IMDM, eine Anpassung ausgewählter Medienkomponenten an den Bedarf von tierischen Zellkulturen vorgenommen. Alle Pulvermedien wurden mit Natriumhydrogencarbonat laut Herstellervorschrift angesetzt und sterilfiltriert (0,1 µm, Acrocap, Pall, East Hills, NY, USA).

*PBS:* 150 mmol/l NaCl (Serva, Heidelberg), 8 mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Fluka, Buchs, Schweiz), 3 mmol/l KCl (Fluka) 1,5 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fluka), pH 7,4.

*L-Ascorbat-2-Phosphat*

(Sigma) 100x Stocklösung: 20 mmol/l L-Ascorbat-2-Phosphat in MilliQ-Wasser, sterilfiltriert (0,1 µm, Acrocap), aliquotiert und gelagert bei –20°C.

*β-Glycerophosphat*

(Sigma) 100x Stocklösung: 1000 mmol/l β-Glycerophosphat in MilliQ-Wasser, sterilfiltriert (0,1 µm) aliquotiert und gelagert bei –20°C.

*Dexamethason (Sigma)*

10.000x Stocklösung: 0,1 mmol/l Dexamethason in MilliQ-Wasser, sterilfiltriert (0,22 µm, Millipore), aliquotiert und gelagert bei –20°C.

*Penicillin/Streptomycin*

(Invitrogen) 100x Stocklösung: 10.000 I.E./ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycinsulfat in 0,85%iger Kochsalzlösung.

*1α,25-Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub>*

(Sigma) 10.000x Stocklösung: 0,1 mmol/l 1α,25-Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> in MilliQ-Wasser, sterilfiltriert (0,22 µm), aliquotiert und unter Lichtausschluss gelagert bei –20°C.

*Cytokine:*

bFGF, PDGF-BB, IGF-I, EGF und TGF-β (alle Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) wurden lyophilisiert geliefert. Der Puffer zur Rekonstituierung wurde laut Herstellerangaben cytokinspezifisch eingesetzt: bFGF und IGF-1 wurden in 5 mmol/l Tris-Puffer, pH 7,6, PDGF-BB in 10 mmol/l Essigsäure und EGF und TGF-β in Wasser rekonstituiert. Die Cytokinlösungen wurden in PBS mit 1% BSA als Carrierprotein zur Lagerung in Aliquots zu je 100 ng verteilt und bei –20°C gelagert.

*Fötales Kälberserum (Invitrogen):*

Das als Mediensupplement verwendete fötale bovine Serum (FBS) wurde von der Firma Sigma (St.Louis, MO, USA) bezogen. Nach dem Auftauen wurde das Serum zur Inaktivierung von Faktoren des Komplementsystems für eine Stunde bei 56°C inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert.

**2.1.2 Primärzellkultur und Subkultivierung***2.1.2.1 Zellisolation und Primärzellkultur von Knochenvorläuferzellen der Ratte*

Bei der Primärzellisolation wurde nach einem modifizierten Verfahren der differentiellen Adhäsion (Friedenstein, 1976) zur Isolation der nicht hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks vorgegangen.

Weibliche Ratten des Inzuchtstammes Wistar WKY (Med. Hochschule, Hannover) wurden durch CO<sub>2</sub>-Begasung (Flussrate ca. 5 l/min, 45-60 s) betäubt und anschließend dekapitiert. Zur Entnahme der Oberschenkelknochen wurden die Tiere bäuchlings fixiert und am Eingriffsort gründlich mit Ethanol (70%) besprüht. Die Haut wurde beginnend am Schwanz entlang der Wirbelsäule aufgeschnitten und großflächig bis zum Kniegelenk der Hinterläufe entfernt. Das umliegende Muskelgewebe wurde entlang des Femurs mittels eines Skalpells geöffnet, ohne die Knochenhaut und blutführende Gefäße zu verletzen. Der so freigelegte Femur wurde aus Knie- und Hüftgelenk gelöst, indem die haltenden Sehnen an den Epiphysen durchtrennt und der Knochen mit einer Schere aus den Gelenkschalen geschnitten wurde. Dabei sollten die Epiphysen weitgehend intakt bleiben, um die die Sterilität gewährleistende Unversehrtheit des Knochens zu erhalten.

Die Knochen wurden dann 3 mal für jeweils 10 min in 5 ml Waschmedium (ZKT-I, 10% Penicillin/Streptomycin) gegeben und unter einer Sterilwerkbank (Haereus Laminair, Kendro, Hanau) weiterbehandelt. Die Epiphysen wurden oberhalb der Wachstumsfuge abgeschnitten und das so freigelegte rote Knochenmark mit Hilfe einer 10 ml-Spritze und einer 21-Gauge-Kanüle mit Zellkulturmedium (ZKT-I, 1% Pen/Strep, 15% FBS, L-Ascorbat-2-Phosphat 0,2 mM,  $\beta$ -Glycerophosphat 10 mM, Dexamethason  $10^{-8}$  M) ausgespült. Dabei wurde von jeder Seite des Knochens dreimal mit ca. 5 ml Medium gespült. Die so erhaltene Zellsuspension wurde gepoolt und nach Bestimmung der Gesamtzellzahl und Vitalität auf T75-Flaschen (Becton Dickinson, Heidelberg) verteilt. Pro verwendetem Femur wurde hierbei eine T75-

Flasche eingesetzt. Bis zum ersten Mediumwechseln nach 48 Stunden wurden die Zellkulturflaschen ruhen gelassen, dann wurde das Zellkulturmedium abgenommen und der Zellrasen dreimal mit PBS gewaschen, um nicht adhären Zellen zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit frischem Zellkulturmedium überschichtet. Das Medium wurde in der Folge alle drei Tage gewechselt. An Tag 6 nach der Isolation wurde mittels eines transparenten Gitters, das auf den Flaschen fixiert wurde, die Koloniendichte unter dem Mikroskop (Axiovert 120, Zeiss, Jena) ausgezählt.

#### *2.1.2.2 Subkultivierung*

Nach 5 bis 7 Tagen wurden die Primärzellen subkonfluent passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium abgenommen, die adhären Zellen dreimal mit 5 ml warmen PBS gewaschen und für 10 min mit 3 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung (Invitrogen) vom Boden der T75-Kulturflasche abgelöst. Die Zellsuspension wurde in 3 ml ZKT-I, 15% FBS, Pen/Strep aufgenommen und bei 800g 3 min abzentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5403, Hamburg). Danach wurde das Pellet in 5 ml Kulturmedium aufgenommen und nach Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung in einer Dichte von 5.000 Zellen/cm<sup>2</sup> auf T75-Kulturflaschen ausplattiert. Die weitere Subkultivierung erfolgte nach demselben Schema. Die Zellen wurden subkonfluent passagiert, da insbesondere in späteren Passagen bei erreichter Konfluenz eine Vereinzelnung der Zellen ohne Kollagenase-Verdau erschwert ist.

#### *2.1.2.3 Humanzellen*

Für die Versuche mit humanen osteogenen Zellen wurden zwei Arten von Zellmaterial eingesetzt. Einerseits osteogene Zellen aus spongiösen Knochenproben des Oberschenkelkopfes, die durch Ausspülen und differentielle Adhäsion gewonnen wurden (Bertram, 2002), andererseits primäre osteogene Zellen eines männlichen Spenders, die aus einer operativ entfernten heterotopen Ossifikation gewonnen wurden (Mayer, pers. Mitteilung). Heterotope Ossifikationen sind nach einem Trauma in anderen Geweben auftretende gutartige Knochentumore. Die daraus gewonnenen Zellen zeigten ein hohes proliferatives Potenzial und ähnliche Charakteristika wie normale Knochenvorläuferzellen. Die Kollagen- und AP-Synthese ist allerdings in vielen Fällen erhöht (Sell et al., 1998).



#### 2.1.2.4 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Kristallviolettlösung: 21 g Citrat-monohydrat (Merck, Darmstadt), 0,5 g Kristallviolett (Sigma, St. Louis, MO, USA), ad 900 ml mit MilliQ-Wasser, 0,1% Triton X-100 (Sigma), ad 1000 ml mit MilliQ-Wasser.

Trypanblaulösung: 0,9 g NaCl, 0,5 g Trypanblau (Merck), ad 100 ml mit Wasser.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit dem Farbstoff Kristallviolett in der verbesserten Zählkammer nach Neubauer (Omnilab, BLB, Braunschweig). Dazu wurden die Zellsuspensionen 1:2 bzw. bei größeren Zellkonzentrationen 1:10 mit Kristallviolettlösung versetzt und unter dem Mikroskop (Axiovert 120, Zeiss, Jena) bei 200-facher Vergrößerung gezählt. Der Farbstoff färbt die Zellkerne der mit Triton X-100 lysierten Zellen violett.

Nach demselben Prinzip wurde die Lebendzellkonzentration bestimmt. Der Farbstoff dringt allerdings hierbei nur in nekrotische Zellen mit einer durchlässigen Zellmembran ein, die man dadurch gut von lebenden unterscheiden kann (Walford et al. 1964).

#### 2.1.2.5 Berechnung der Verdopplungszeit

Zur Abschätzung der proliferativen Aktivität einer gegebenen Kultur wurde aus den bei der Subkultivierung bestimmten Lebendzellzahlen die Verdopplungszeit der Zellen berechnet. Dabei wird näherungsweise exponentielles Wachstum der Zellen vorausgesetzt. Diese Näherung scheint gemittelt über die Kulturdauer von 5-7 Tagen zulässig, da die Lag-Phase der teilungsfähigen osteogenen Zellen 12-24h nach der Adhäsion beendet war.

Ausgehend von der Formel für exponentielles Wachstum (1) erhält man die Formel für die Halbwertszeit (4):

$$c = c_0 \cdot e^{\mu t} \quad (1)$$

mit t: Zeit  
c: Zellkonzentration zum Zeitpunkt t  
c<sub>0</sub>: Zellkonzentration zum Zeitpunkt t=0  
μ: spezifische Wachstumsrate

für die Verdopplungszeit  $t_2$  gilt:

$$c = 2 \cdot c_0 \quad (2)$$

$$\Rightarrow 2 \cdot c_0 = c_0 \cdot e^{\mu t_2} \quad (3)$$

$$t_2 = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (4)$$

Für die spezifische Wachstumsrate  $\mu$  ergibt sich durch umformen aus derselben Gleichung (1) mit der Zellkonzentration  $c_0$  zum Zeitpunkt  $t_0$ :

$$\mu = \frac{\ln(c) - \ln(c_0)}{t - t_0} \quad (5)$$

### 2.1.3 Kryokonservierung

*Kryomedium:* 10% ZKT-I, Pen/Strep; 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma, St.Louis, USA); 80% FBS.

Um reproduzierbares Arbeiten mit einem umfangreichen Pool von vergleichbaren Primärzellen zu gewährleisten, spielt die Kryokonservierung eine entscheidende Rolle. Die einzufrierende Kultur wurde zunächst abtrypsiniert (siehe 2.1.2.2) und gezählt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen erneut zentrifugiert, (3 min, RT, 800g, Eppendorf Zentrifuge 5403) der Überstand verworfen und die Zellen in einem geeigneten Volumen vereinzelt, in Kryomedium aufgenommen und in Volumina von 1 ml in Kryoröhrchen aliquotiert. Diese wurden in einer Kryobox (Abkühlgeschwindigkeit 1°C/min, *freezing container*, Nalgene, Rochester, NY) über Nacht bei –70°C gelagert und sind danach in der Gasphase über flüssigem Stickstoff langfristig lagerbar.

Das Auftauen der kryokonservierten Zellen sollte zügig geschehen, indem das Kryoröhrchen möglichst ohne Zeitverlust in einem auf –20°C gekühlten Behälter aus dem Kryotank in ein 37°C-Wasserbad überführt wurde. Die aufgetaute Zellsuspension wurde bei 800g 3 min bei RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in vorgewärmten Zellkulturmedium aufgenommen. Nach der Bestimmung von Zellzahl und –vitalität wurden die Zellen in eine geeignete Zellkulturflasche überführt und bei 37°C inkubiert.

### 2.1.4 Beschichtung von Zellkulturoberflächen

#### *Gelatinebeschichtung*

Die Gelatinebeschichtung von Oberflächen erfolgte mit einer 1%igen Gelatinelösung in PBS, die durch Einwiegen der entsprechenden Menge Gelatine (Gibco BRL, Eggenstein) in steriles PBS hergestellt wurde. Die Gelatine löste sich im Laufe des anschließenden Autoklaviervorganges.

Die zu beschichtenden Oberflächen wurden mit der Gelatinelösung bedeckt und für mindestens 30 min bei 37°C inkubiert. Die überschüssige Lösung wurde danach abgesaugt und die beschichteten Gefäße innerhalb von 24 Stunden verwendet.

#### *Kollagen I*

Zur Beschichtung von Zellkulturoberflächen mit Kollagen I wurden diese mit einer 0,1%igen Lösung von Rattenschwanzkollagen in 0,1%iger Essigsäure (98% Kollagen I, Sigma, St. Louis, USA) über Nacht bedeckt. Die überschüssige Lösung wurde abgesaugt und die Kulturoberfläche anschließend einmal mit Kulturmedium gewaschen. Die beschichteten Kulturgefäße sollten innerhalb von 7 Tagen verwendet werden.

#### *Laminin*

Zur Lamininbeschichtung von Kulturoberflächen wurde aus Engelbreth-Holm-Swarm Maustumoren isoliertes 1,984 mg/ml Laminin in 0,05 mol/l Tris, 0,15 mol/l NaCl, pH 7,4 (Becton Dickinson Biosciences, Bedford, MA, USA) verwendet. Die eingefrorene Lamininstocklösung wurde bei 4°C über Nacht aufgetaut und mit 39,5 ml serumfreiem ZKT-I auf eine Konzentration von 0,025 mg/ml verdünnt. Die Überschichtung erfolgte mit 1 ml/25cm<sup>2</sup>, so dass die Beschichtungskonzentration bei 1 µg/cm<sup>2</sup> lag. Die mit Lamininlösung überschichteten Kulturgefäße wurden bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert, überschüssige Lösung anschließend abgesaugt und einmal vorsichtig mit serumfreiem ZKT-I gewaschen. Die beschichteten Kulturgefäße wurden sofort verwendet.

#### *Fibronectin*

Die Beschichtung der Kulturgefäße mit humanen Fibronectin (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) erfolgte in Anlehnung an die Vorgaben des Herstellers. Das in 100 mM CAPS (3-(Cyclohexylamino)-1-Propan-sulfonsäure), 0,15 M NaCl, 1 mM

CaCl<sub>2</sub>, pH 11,5 lyophilisierte Fibronectin wurde bei RT in 1 ml sterilem MilliQ-Wasser gelöst und entweder sofort verwendet oder aliquotiert und bei –20°C für höchstens zwei Wochen gelagert. Zur Beschichtung wurde die Stocklösung der Konzentration 5 mg/ml mit serumfreien ZKT-I auf eine Konzentration von 0,025 mg/ml verdünnt. Die Überschichtung erfolgte mit 1 ml/25cm<sup>2</sup>, so dass die Beschichtungskonzentration bei 1 µg/cm<sup>2</sup> lag. Die mit Lamininlösung überschichteten Kulturgefäße wurden bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert, überschüssige Lösung anschließend abgesaugt und einmal vorsichtig mit serumfreiem ZKT-I gewaschen. Die beschichteten Kulturgefäße wurden sofort verwendet.

### *Fibrin*

Zur Beschichtung mit Fibrin wurde das u.a. als Gewebekleber klinisch eingesetzte Tissucol-Kit 0,5 Immuno (Baxter, Heidelberg) verwendet. Dieses Zweikomponentensystem beruht auf dem Umsatz von Fibrinogen durch das Enzym Thrombin zu Fibrin. Eine Komponente enthält neben Fibrinogen das Fibrin stabilisierende Aprotinin. Die zweite Komponente enthält Thrombin in einer Calciumchloridlösung. Das eigentlich zur Gewebeklebung oder Blutstillung einzusetzende Material wurde für die vorliegende Anwendung 1:50 mit sterilem Wasser bzw. steriler Calciumchloridlösung verdünnt. Die beiden Komponenten enthielten dann ca. 0,9 mg/ml humanes Fibrinogen bzw. 10 I.E. humanes Thrombin. Zur Beschichtung von Multiwellplatten und Zellkulturflaschen wurde zunächst die Thrombinkomponente in die Wells pipettiert, so dass der Boden gerade bedeckt war. Danach wurde dasselbe Volumen der Fibrinogenkomponente hinzu pipettiert und direkt im Anschluss auf dem Plateshaker (Thermomixer comfort, Eppendorf) 5 s bei 1000 UPM geschüttelt. Die Platten konnten, sofern sie nicht sofort nach dem Aushärten eingesetzt wurden, bis zu 14 Tage bei 4°C gelagert werden.

Zum Einsatz bei der Besiedlung von dreidimensionalen Trägermaterialien wurde zunächst die Thrombinkomponente (250 µl/cm<sup>3</sup>) einseitig auf das Trägermaterial getropft. Die zur Besiedlung bestimmte Zellsuspension wurde 1:1 mit einer doppelt konzentrierten Fibrinogenkomponente (ca. 1,8 mg/ml) versetzt. Diese Suspension wurde dann tropfenweise auf das mit der Thrombinkomponente vorbehandelte Trägermaterial gegeben (250 µl/cm<sup>3</sup>).

## **2.2 Biochemische Analytik**

### **2.2.1 Alkalische Phosphatase Aktivität**

Zur Quantifizierung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP) wurde der Umsatz des farblosen Substrats para-Nitrophenylphosphat (pNPP, Sigma) zu dem gelb gefärbten Nitrophenol durch Bestimmung der Absorption bei 405 nm in einem ELISA-Reader gemessen. Die Umrechnung in Units ( $1 \text{ U} = 1 \mu\text{mol}/\text{min} = 16,67 \text{ nkat}$ ) erfolgte anhand einer Eichgerade, die mit aufsteigenden Nitrophenol-Konzentrationen (Merck, Darmstadt) erstellt wurde.

Alkalische Phosphatase ist der bekannteste frühe Marker für Osteoprogenitoren. Man findet sie bei der *in vitro* Kultivierung in zwei Formen: erstens die membrangebundene AP, die über einen Phospholipidanker an der Membran der Osteoprogenitoren gebunden ist und zweitens die lösliche AP.

#### *2.2.1.1 Quantifizierung der membrangebundenen Alkalischen Phosphatase*

Das Kulturmedium einer T25-Flasche wurde vollständig abgezogen. Der Zellrasen wurde nach dem Waschen mit 1 ml kaltem PBS überschichtet und mittels eines Zellschabers (Becton Dickinson) abgekratzt. Die Zellen wurden im Eis in PBS in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Analyse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die folgenden Arbeiten wurden bei  $4^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Zur Analyse wurden die Zellen nach dem Auftauen abzentrifugiert ( $4^{\circ}\text{C}$ , 12.000g, 3 min). Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 330  $\mu\text{l}$  PBS homogenisiert und in zehn Aliquots zu 30  $\mu\text{l}$  aufgeteilt. Bei starker Kollagenbildung wurde die Homogenisation mit einem UltraTurrax (T-25 basic, IKA) bei 13.000 UPM, unter Eiskühlung durchgeführt.

Zur Aktivitätsbestimmung wurde ein Aliquot mit 300  $\mu\text{l}$  der pNPP-Reaktionslösung versetzt und 20 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 3x 50  $\mu\text{l}$  abgenommen, bei  $4^{\circ}\text{C}$  in eine 96-Lochplatte überführt und bei 405 nm im ELISA-Reader (SLT 340 ATTC, SLT Labinstrumente, Crailsheim) vermessen. Als Nullkontrolle wurden 30  $\mu\text{l}$  PBS mit 300  $\mu\text{l}$  pNPP-Reaktionslösung versetzt und denselben Inkubationszeiten ausgesetzt.

#### *2.2.1.2 Quantifizierung der löslichen Alkalischen Phosphatase*

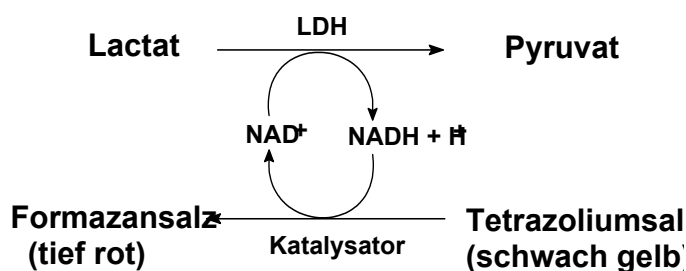
Zur Bestimmung der AP-Aktivität im Kulturmedium wurde eine Medienprobe von 150  $\mu\text{l}$  aus dem Kulturüberstand abgenommen. Die Probe wurde bis zur Analyse bei

-20°C gelagert. Nach dem Auftauen der Probe bei RT wurde diese in 6 Aliquots zu je 20 µl in die Wells einer 96-Well-Platte gegeben. Dazu wurden je 200 µl der pNPP-Reaktionslösung pipettiert und die Platte auf einem Plateshaker bei 700 UPM für 30 s geschüttelt. Im Anschluss wurden die Proben für 24 h bei 37°C inkubiert und dann ebenfalls bei einer Wellenlänge von 405 nm im ELISA-Reader vermessen. Als Nullkontrolle wurde zellfreies Kulturmedium denselben Schritten unterzogen.

### 2.2.2 Quantifizierung des extrazellulären Calciums

Zum Nachweis der Mineralisierungsaktivität der Zellen wurde ein fluoreszenzphotometrisches Verfahren angewendet, das auf der Ausbildung von ionischen Wechselwirkungen zwischen Calcein (Sigma, St. Louis, USA) und in der extrazellulären Matrix eingelagerten Calciumphosphaten beruht (Hale et al., 2000). Der fluoreszierende Calcein-Calcium-Komplex wurde durch Licht der Wellenlänge 485 nm (Streubreite des Filters: 20 nm) angeregt und emittiert nachfolgend Licht der Wellenlänge 530 nm (Streubreite des Filters: 25 nm). Anregung und Absorption erfolgten während der Messung im Fluoreszenzphotometer (Cytofluor 2350, Millipore, Eschborn) automatisch. Zur Messung wurden die fixierten Zellen zweimal mit Wasser gewaschen und anschließend mit der Calceinfärbelösung (5 µg/ml Calcein/H<sub>2</sub>O) überschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde der Zellrasen zweimal mit Wasser gewaschen und im Fluoreszenzphotometer gemessen. Die Bestimmung absoluter Calciumwerte war mit dieser Methode nicht möglich. Es konnte lediglich eine relative Zu- oder Abnahme der Menge des extrazellulären Calciums bestimmt werden. Daher war auf jeder zu vermessenen Platte ein Blindwert erforderlich.

### 2.2.3 Quantifizierung der Lactatdehydrogenase



**Abbildung 2.1:** Testprinzip der LDH Bestimmung, die auf einer gekoppelten katalytischen Reaktion beruht.

Die Quantifizierung der cytosolischen Lactatdehydrogenase (LDH) im Kulturüberstand ermöglicht einen Rückschluss auf die Anzahl lysierter Zellen in der Kultur (Szekeres et al., 1981). Die Bestimmung wurde durchgeführt mit Hilfe des colorimetrischen

*Cytotoxicity Detection Kit* (Roche, Mannheim). Das Testprinzip beruht auf der Kopplung zweier katalytischer Reaktionen. In der ersten Reaktion wird 1 mol Lactat ( $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3$ ) unter LDH-Katalyse zu 1 mol Pyruvat ( $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_3$ ) umgesetzt. Dabei wird 1 mol  $\text{NADH}+\text{H}^+$  aus  $\text{NAD}^+$  gebildet. In der zweiten Reaktion wird unter Umsatz von  $\text{NADH}+\text{H}^+$  ein gelbes Tetrazoliumsalz katalysiert in ein rotes lösliches Formazansalz umgesetzt (s. Abb. 2.1).

Zur Bestimmung des LDH-Gehaltes wurden die Katalysator/ $\text{NAD}^+$ -Lösung und die Färbelösung direkt vor Versuchsbeginn gemischt und 1:1 mit 100  $\mu\text{l}$  des zu testenden Medienüberstandes vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei RT im Dunkeln wurde die Bildung des löslichen roten Formazans im ELISA-Reader bei 492 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) gemessen.

Die Medienproben wurden maximal 3 Tage bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert und dann gemeinsam vermessen. Zur Ermittlung eines Messwertes wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Als Nullkontrolle wurde nicht in der Zellkultur eingesetztes Kulturmedium mitgeführt.

#### **2.2.4 Bestimmung des Ammoniumgehalts im Medium**

Ammonium ist neben Lactat ein weiteres Produkt des Energiestoffwechsels von tierischen Zellen. Neben dem glykolytischen Abbau von Glucose wird ein großer Anteil der Energie (bis zu 50% bei Anwesenheit von ausreichend Glucose im Medium) aus der Glutaminoxidation (Glutaminolyse) gewonnen (Reitzer et al., 1979). Bei hoher Glucosekonzentration wird dieser Anteil allerdings erniedrigt (Zielke et al., 1978). Im Verlauf der Glutaminolyse wird Glutamin zu  $\alpha$ -Ketoglutarat deaminiert und in den Citratcyclus eingeleitet, wo das Glutamin entweder vollständig zu  $\text{CO}_2$  und Wasser oxidiert wird (Reitzer et al., 1979) oder in unterschiedlichen Kombinationen aus den Endprodukten  $\text{CO}_2$ , Ammonium, Alanin, Aspartat und Lactat freigesetzt wird.

Zur Bestimmung der Ammoniumkonzentration im Medium wurde eine Eichkurve mit Ammoniumchlorid (Riedel de Haën, Seelze) erstellt. Dazu wurde eine 100 mM Stammlösung angesetzt und so mit Wasser verdünnt, dass man eine Eichkurve der Konzentrationen 5; 3; 2,5; 2; 1,5; 1; 0,5 und 0 mM erhält. Zur Messung wurden 5  $\mu\text{l}$  des Standards oder der Probe in eine Vertiefung einer 96-Lochplatte pipettiert. Dazu wurden zunächst 125  $\mu\text{l}$  des Phenolreagenzes (Phenol-Nitroprussid-Lösung, Sigma) und dann 125  $\mu\text{l}$  des Hypochloritreagenzes (Natriumhypochlorit, 0,2%, Sigma)

gegeben. Die abgedeckte Platte wurde dann für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Platte auf Raumtemperatur abgekühlt und bei 570 nm im ELISA-Reader gemessen. Zur Ermittlung eines Messwertes wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Als Nullkontrolle wurde nicht in der Zellkultur eingesetztes Kulturmedium mitgeführt.

### **2.2.5 Bestimmung der Zellvitalität mit WST-1**

Der eingesetzte WST-1 Test von Roche beruht wie vergleichbare Tests (MTT, XTT, MTS) auf der enzymkatalysierten Bildung eines Formazans aus einem löslichen Tetrazoliumsalz. Die Reaktion wird von mitochondrialen Dehydrogenasen katalysiert, deren Gesamtkonzentration mit wachsender Zellzahl ansteigt. Die Verwendung des löslichen WST-1, das zu einem ebenfalls löslichen Formazan umgesetzt wird, erleichtert seine Anwendung gegenüber anderen Proliferationstests wie [<sup>3</sup>H]-Thymidin oder BrdU-Einbau insbesondere bei adhärenenten Zellen dahingehend, dass weder eine Zellernte noch eine Vielzahl verschiedener Wasch- und Inkubationsschritte durchgeführt werden müssen. Vielmehr können Kultivierung, Inkubation mit WST-1 und Messung im ELISA-Reader in derselben 96-Well-Platte durchgeführt werden. Dies ermöglicht einen hohen Probendurchsatz mit verhältnismäßig geringem Zeitaufwand.

Die WST-1-Lösung wurde dem vorgewärmten Kulturmedium im Verhältnis 1:10 zugesetzt. Das alte Medium wurde abgesaugt und durch 100 µl des mit WST-1 versetzten Mediums ersetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min konnte die Bildung des Formazans durch Messung der optischen Dichte bei 450 nm gegen einen Blindwert im ELISA-Reader bestimmt werden.

### **2.2.6 Bestimmung der Zellzahl mit Hoechst 33258**

Die Bestimmung der Zellzahl mit dem Hoechst 33258 Fluoreszenzfarbstoff (Serva, Heidelberg) beruht auf der Quantifizierung der Gesamt-DNA einer Probe (West et al., 1985). Diese Nachweismethode eignet sich besonders für dreidimensionale Kulturen in Trägermaterialien oder nicht vereinzelbare Zellverbände. In diesen Fällen kann ein tryptischer Verdau nicht zuverlässig zählbare Zellsuspensionen liefern (Goldstein et al., 1999).

Zu testende Zellkulturen in Flaschen oder Trägern wurden einmal mit warmem PBS gewaschen und dann in ein konisches Röhrchen (10 ml) überführt. Zweidimensionale Zellkulturen wurden mit einem Zellschaber unter PBS von der Plastikoberfläche



abgelöst und im konischen Röhrchen 3 min bei 800g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dreidimensionale Träger wurden mit einer Pasteurpipette weitgehend trocken gesaugt und mit einer sterilen Pinzette (Aesculap) in das konische Röhrchen überführt.

Die Proben wurden in den konischen Röhrchen mit 1,4 ml kalter EDTA Lösung (10 mmol/l, pH 12,3; Fluka, Buchs, CH) überschichtet und bei 13.000 UPM für 1 min im Ultraturrax (T-25 basic, IKA) homogenisiert. Danach wurden die Homogenisate für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der pH-Wert bei 4°C durch Zugabe von 0,1 ml Kaliumdihydrogenphosphatlösung (0,95 M, Merck, Darmstadt) auf pH 7,0 eingestellt. Kurz vor der Messung wurden 1,5 ml einer kalten Hoechst 33258-Lösung (200 ng/ml in 100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7,0) zupipettiert und kurz auf dem Vortex-Schüttler (Vortex Genie 2, Bender & Hobein, Zürich, CH) gemischt. Dann wurden 6 mal je 200 µl des Homogenisats in die Wells einer 96-Lochplatte (Becton Dickinson, Heidelberg) pipettiert und in einem Fluoreszenzphotometer (Emission: 350; Absorption: 455; Cytofluor 2350, Millipore, Eschborn) vermessen (Goldstein et al., 1999). Zur Bestimmung der Zellzahl aus den so erhaltenen Absorptionswerten, wurden die Daten mit einer Eichgerade aus bekannten Zellzahlen ( $1 \cdot 10^7$ ;  $5 \cdot 10^6$ ;  $1 \cdot 10^6$ ;  $5 \cdot 10^5$ ;  $1 \cdot 10^5$ ;  $5 \cdot 10^4$ ;  $1 \cdot 10^4$ ;  $5 \cdot 10^3$ ;  $1 \cdot 10^3$ ) verglichen. Bis zu einer Zellzahl von minimal  $1 \cdot 10^4$  Zellen war eine gut reproduzierbare Korrelierbarkeit der erhaltenen Messwerte gegeben. Der Einfluss des Trägermaterials wurde kontrolliert, indem zellfreies Trägermaterial als Nullkontrolle mitgeführt wurde.

Träger, die  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP) enthielten, störten die DNA-Messung erheblich. Dies konnte deutlich verbessert werden, indem anstelle der EDTA-Lösung eine Natriumphosphatlösung eingesetzt wurde (0,1 mol/l  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 1,9 mol/l NaCl) und nach Homogenisieren und Absetzen lassen, der Überstand dekantiert wurde. Durch Zugabe von Phosphorsäure (1,0 mol/l) wurde der Überstand auf pH 7,0 eingestellt (Arnold et al., 2002). Die weiteren Schritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

### 2.2.7 Gesamtproteinbestimmung mit BCA

Zur Gesamtproteinbestimmung der Zellen wurde das Micro BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) verwendet. Diese Methode beruht auf der Reduktion von zweiwertigen Kupferionen durch Proteine unter basischen Bedingungen. Der gebildete Kupfer(I)-Komplex wird von zwei BCA-Molekülen

(*Bicinchoninic Acid*) in einem violettgefärbten Chelat-Komplex gebunden. Das Absorptionsmaximum dieses Komplexes liegt bei 562 nm, Messungen zwischen 540 und 590 nm sind möglich.

Die Messungen wurden in Microtiterplatten (96-Lochplatten) durchgeführt. Dazu wurden 150 µl des Standards oder der Probe mit 150 µl des Färbereagens versetzt, 2 Stunden bei 37°C inkubiert, auf Raumtemperatur abgekühlt und die Absorption im ELISA-Reader bei 570 nm gegen einen Nullwert gemessen. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Das Färbereagenz wurde vor der Messung aus den drei Lösungen A, B und C im Verhältnis 25:24:1 hergestellt. Lösung A ist eine wässrige Lösung von Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, Natriumtartrat und 0,2 mol/l Natriumhydroxid. Lösung B ist eine 4%ige wässrige BCA-Lösung und Lösung C ist eine 4%ige Lösung von Kupfersulfat-Pentahydrat in Wasser.

Zur Probenvorbereitung wurden die Zellen in 48-Lochplatten mit 450 µl Lysispuffer (Boehringer Mannheim; Kat. Nr. 1758241) überschichtet und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Lysat durch mehrfaches Aufziehen mit einer Microliterpipette gemischt und in die Microtiterplatte überführt.

Die Eichkurve wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe des Proteinstandards Rinderserumalbumin (*Bovine Serum Albumine*, 1mg BSA/ml in 0,15 M NaCl, Sigma) erstellt (Smith et al., 1985).

### 2.2.8 Quantifizierung von Osteocalcin

Osteocalcin ist ein im Medium instabiles Protein, weshalb die Überführung dieses 5.800 Dalton kleinen Proteins in die Kälte schnell erfolgen sollte, um die Osteocalcinkonzentration zum Zeitpunkt der Probennahme zu konservieren. Die Probenahme erfolgte daher in ein vorgekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß auf Eis, um die Probe dann möglichst schnell bei -20°C einzufrieren. Obwohl es sich bei dem Test um einen für Ratten-Osteocalcin spezifischen ELISA handelt, können hohe Konzentrationen boviner Proteine und IgGs die Osteocalcin-Quantifizierung stören, weshalb maximal 1% FBS in der Probe zu tolerieren sind. Bei serumhaltigem Kulturmedium (15%) muss daher 48 Stunden vor Probennahme ein Wechsel auf serumfreies Kulturmedium vorgenommen werden. Bei serumreduzierter (1% FBS) Kulturführung kann die Probenahme ohne vorherigen Mediumwechsel stattfinden. Dieser sollte aber aus Gründen der Vergleichbarkeit ebenfalls 48h vor Probennahme stattfinden.

Zur Quantifizierung von Osteocalcin im Medienüberstand wurde ein für Ratten-Osteocalcin spezifischer *Sandwich*-ELISA eingesetzt (BTI, Stoughton, MA, USA). Zur Generierung der Standardkurve wurde aufgereinigtes Osteocalcin der Ratte verwendet. Dazu wurde die 100 ng/ml Stammlösung so verdünnt, dass man folgende Konzentrationsreihe erhielt: 0,33; 1,00; 2,5; 5; 10 und 20 ng/ml. Als Nullkontrolle wurden mit Probenpuffer versetztes Kulturmedium aus nicht besiedelten Wells mitgeführt. Alle Standards, Nullkontrollen und Proben wurden in Doppelbestimmung gemessen. Zunächst wurden 100 µl der zu analysierenden Probe in die antikörperbeschichtete 96-Lochplatte pipettiert. Während der Inkubationszeit (24 h, 4°C) band ein oberflächengebundener monoklonaler Antikörper, der gegen die N-terminale Region des Osteocalcins gerichtet war, das Protein in der 96-Lochplatte. Die überschüssige Lösung wurde abgesaugt und dreimal mit 300 µl PBS gewaschen. Danach wurden 100 µl Osteocalcin-Antiserum (Ziege, polyklonal) in jede Vertiefung pipettiert. Die abgedeckte Platte wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert, wobei sich die polyklonalen Antikörper hochspezifisch an den C-Terminus des Osteocalcins anlagerten. Nach einem erneuten Waschschrift (3x300 µl PBS) wurden 100 µl des Esel anti-Ziegen IgG Peroxidase Konjugates in jede Vertiefung pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (3x300 µl PBS) wurden 100 µl des frisch angesetzten Substratmixes (TMB-Lösung/ Wasserstoffperoxidlösung, 1:1) in jede Vertiefung pipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe der Stop-Lösung (100 µl/Well) wurde die Platte sofort im ELISA-Reader geschüttelt (120/min) und bei 450 nm gemessen.

### 2.2.9 Quantitative Bestimmung von Glucose und L-Lactat

Die Messung der Glucose- und L-Lactatkonzentration in Kulturüberständen erfolgte mit dem automatischen Glucose/Lactat Analysator (YSI, Modell 2700, Yellow Springs, OH, USA) mit interner Kalibriervorrichtung. Grundlage der Messung ist ein elektrochemisch gekoppelter Prozess, bei dem D-Glucose bzw. L-Lactat unter Beteiligung von Sauerstoff durch die auf den Membranen immobilisierten Enzyme Glucoseoxidase bzw. Lactatoxidase umgesetzt werden. Das dabei entstehende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird dann mit Pt/Ag, AgCl-Elektroden detektiert.

## **2.3 Histologische Färbetechniken**

### **2.3.1 Alkalische Phosphatase Färbung**

Paraformaldehyd-Lösung: Die 5%-ige (w/v) Formaldehydlösung in PBS wurde aus Paraformaldehyd (PFA, Fluka, Buchs, Schweiz) durch Depolymerisation in Lösung hergestellt. Dazu wurden 1,85 g Paraformaldehyd in 65 ml Milli-Q-Wasser suspendiert und auf 60 °C unter ständigem Rühren erwärmt. Dann erfolgte die Zugabe von einigen Tropfen 2 N NaOH (Serva, Heidelberg) bis die Depolymerisation einsetzt. Anschließend wurden 10 ml 10x PBS zugegeben, der pH-Wert mit HCl auf 7,4 eingestellt und mit Milli-Q-Wasser ad 100 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Färbelösung: Eine NBT/BCIP-Tablette (NBT= Nitroblue-Tetrazoliumsalz, BCIP=5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat, Roche, Mannheim) wurde in 10 ml Wasser gelöst und bei 4°C unter Lichtausschluss gelagert.

Die mit Paraformaldehyd-Lösung fixierten Zellen wurden mit Wasser gewaschen und mit der Färbelösung überschichtet. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Absaugen der Färbelösung und dreimaliges Waschen mit sterilem Wasser gestoppt.

Die membranständige zelluläre Alkalischen Phosphatase katalysiert eine Reaktion zwischen den beiden farblosen Komponenten NBT und BCIP, in deren Verlauf ein blau-schwarzer Niederschlag gebildet wurde. Stellen blauer bis schwarzer Färbung zeigten so das Vorhandensein von Alkalischer Phosphatase an.

### **2.3.2 Mineralisierungsfärbung nach von Kossa**

Bei der von Kossa Färbung kommt es zur Ausbildung von Wechselwirkungen zwischen den extrazellulären Calciumablagerungen und den Silberionen der Färbelösung. Durch deren nachfolgende Reduktion zu elementarem Silber entsteht eine Schwarzfärbung der Mineralisierungszonen.

Silbernitratlösung: 5% (w/v)  $\text{AgNO}_3$  (Merck, Darmstadt) in  $\text{H}_2\text{O}$   
Die Lösung wurde filtriert und unter Lichtausschluss aufbewahrt.

*Natriumcarbonatlösung:* 5 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Merck)  
200  $\mu\text{l}$  Formaldehyd in 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$

Die mit Paraformaldehyd-Lösung fixierten Zellen (s. 2.3.1) wurden mit sterilem Wasser gewaschen, mit Silbernitratlösung bedeckt und unter Lichtabschluss für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen erneut gründlich mit sterilem Wasser gewaschen. Durch Zugabe von Natriumcarbonatlösung erfolgte die Reduktion. Der Reduktionszeitraum betrug 90 s (Chaplin et al., 1975).

### 2.3.3 Sudan-III Färbung von Adipozyten

*Sudan-III-Stammlösung:* 5 g/L Sudan III (Sigma) in Isopropanol (gesättigt)  
abfiltrieren über Falten- und 0,2 $\mu\text{m}$ - Filter (Millipore)

*Sudan-III-Gebrauchslösung:* 6/4 (v/v) Sudan-III-Stammlösung/ hochreines Wasser

Die mit Paraformaldehyd-Lösung fixierten Zellen (s. 2.3.1) wurden einmal mit 60%iger Isopropanol-Lösung gewaschen und anschließend für 15 min mit *Sudan-III-Gebrauchslösung* überschichtet. Nach dem Abziehen der *Sudan-III-Gebrauchslösung* wurde einmal mit 60%iger Isopropanol-Lösung gewaschen. Die Zellen wurden danach mit PBS überschichtet.

### 2.3.4 Alcian Blue Färbung

Durch die Alcian Blue Färbemethode wurden als spezifische Bestandteile der extrazellulären Matrix des Knorpels saure, sulfatreiche Proteoglycane (Keratansulfat, Chondroitin-4- und -6-Sulfat) angefärbt. Dazu wurden die mit kaltem Ethanol p.A. fixierten Zellen zweimal mit sterilem Wasser gewaschen, mit einer Alcian Blue Färbelösung (Sigma, 0,5% in 1 M HCl) bedeckt und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Die Färbelösung wurde anschließend abgesaugt, der Zellrasen dreimal mit sterilem Wasser gewaschen und mit Wasser überschichtet. Die knorpelspezifischen Proteoglycane hoben sich unter dem Lichtmikroskop von den umliegenden hellen Bereichen durch ihre Blaufärbung ab.

## 2.4 Elektronenmikroskopie

Im Elektronenmikroskop wird ein Elektronenstrahl durch elektromagnetische Linsen auf ein entsprechend vorbereitetes Objekt fokussiert. Durch die geringe Wellenlänge der Elektronen können dabei sehr viel höhere Auflösungen als mit einem Lichtmikroskop erreicht werden. Aufgrund des Messprinzips – entweder durchdringen die Elektronen die Probe und werden dabei gebeugt oder sie werden an der Oberfläche reflektiert – wird zwischen der Transmissionselektronenmikroskopie (*transmission electron microscopy*, TEM) und der Rasterelektronenmikroskopie (REM oder *scanning electron microscopy*, SEM) unterschieden. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich letztere Methode eingesetzt.

Mit der Rasterelektronenmikroskopie lassen sich Oberflächenstrukturen darstellen. Dazu werden die jeweiligen Proben mit einer dünnen goldhaltigen Schicht überzogen. Im REM tastet dann ein energiereicher, dünner Elektronenstrahl die Oberfläche der Probe ab. Der Elektronenstrahl setzt in Abhängigkeit des Auftreffwinkels Sekundärelektronen aus der Oberflächenschicht frei, die fokussiert und zu einem räumlichen Bild der Probe verarbeitet werden. Der Bildkontrast im REM ist dabei vom Einfallswinkel der Primärelektronen und der Lage des Detektors zur Probenoberfläche (Topographieeffekt) abhängig. Die Auflösungsgrenze liegt bei 6 nm.

Nach entsprechender Kultivierung der für die Elektronenmikroskopie bestimmten Zellen wurde das Medium vorsichtig abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Glutaraldehyd-Lösung (J.T. Baker, Deventer, NL) in Cacodylatpuffer (Merck, 2,5% (v/v) Glutaraldehyd) überschichtet und eine Stunde bei 4°C inkubiert. Nach Absaugen der Fixierlösung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Bis zur Entwässerung konnte die Probe nun auch längerfristig unter PBS/ 0,01% Natriumazid bei 4°C aufbewahrt werden.

Zu analysierende Trägergerüste wurden an der Oberfläche angeschnitten und dann mittels zweier Pinzetten mittig durchgebrochen. Ein Schneiden der Träger war zu vermeiden, um ein Verschmieren der Zellen an der Schnittfläche zu verhindern.

Zur Entwässerung der Zellen wurden die Deckgläschen in einem Aceton-beständigen Plastikzylinder gleichen Durchmessers überführt und schrittweise mit Lösungen ansteigender Acetonkonzentration (10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100%) überschichtet. Die Inkubationszeit für jede Lösung betrug 15 min bei 4°C, bevor sie durch eine Lösung höherer Konzentration ersetzt wurde. Während dieses

Austausches durfte die Probe allerdings nicht antrocknen. Der letzte Inkubationsschritt mit 100%iger Acetonlösung wurde 2-3mal wiederholt und die letzten zwei Inkubationen bei Raumtemperatur durchgeführt.

Um die Struktur der Zellen zu erhalten, wurde das Aceton anschließend durch die Kritisch-Punkt-Trocknung mit CO<sub>2</sub> entfernt und die Zellen anschließend mit Gold bedampft. Danach konnten die Proben im Elektronenmikroskop (DSM 982 Gemin, Zeiss, Jena) analysiert werden.

## **2.5 Nukleinsäureanalytik**

Die nachfolgenden Arbeiten wurden basierend auf dem allgemeinen Laborhandbuch für molekularbiologische Arbeiten von Maniatis et al. (Maniatis et al., 1989) durchgeführt.

Der Nachweis der Transkription von Proteinen wurde mittels Reverse Transkriptase – Polymerase Kettenreaktion (Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) geführt. Dieses Verfahren besteht aus drei Schritten: der Isolierung der RNA aus den Zellen, der Herstellung der cDNA und der Amplifikation von spezifischen cDNA-Abschnitten mittels PCR. Durch die Isolierung der RNA zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung kann die zeitliche Entwicklung der Transkription von knochenspezifischen Proteinen verfolgt werden. Die Auswahl der zu beachtenden Proteine erfolgt anhand der gewählten PCR-Primer, die die spezifische cDNA-Sequenz des entsprechenden Proteins einschließt.

### **2.5.1 RNA-Isolierung**

Für die Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen wurde basierend auf der „Single Step RNA-Isolation“ Methode Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen) eingesetzt (Chomczynski, 1993).

Zu analysierende Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen (Becton Dickinson, Heidelberg) kultiviert. Zur RNA-Isolation wurde zunächst das Medium abgesaugt und der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen. Zur Lyse der Zellen wurden diese mit 7 ml Trizol<sup>®</sup> für 5 min bei RT inkubiert. Der abgelöste Zellrasen wurde mehrfach mit einer 10 ml-Pipette aufgezogen, homogenisiert und jeweils 1 ml des Homogenisats in ein steriles 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur Trennung der RNA von Proteinen und DNA wurde das Lysat mit 133 µl 2-Bromo-Chloropropan (BCP, Sigma) pro 1 ml Trizol<sup>®</sup> versetzt, für 15 s geschüttelt und für 10 min bei Raumtemperatur

inkubiert. Eine anschließende Zentrifugation für 20 min bei 4°C und 12.000g (Eppendorf Zentrifuge 5415) führte zur Phasentrennung. Die wässrige Phase wurde in 200 µl Aliquots abgenommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Organische und Interphase, in denen Proteine respektive genomische DNA vorliegen, wurden bei -20°C gelagert.

Um die RNA zu fällen, wurde die Lösung mit 1 ml Isopropanol (J.T. Baker) pro Reaktionsgefäß versetzt und nach leichtem Schütteln für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die gefällte RNA wurde durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 12.000g pelletiert. Das erhaltene RNA-Pellet wurde mit 75% (v/v) Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O (Diethylpyrocarbonat, Sigma) aufgenommen. Zur Lösung des Pellets wurde es für 10 min auf 55°C erhitzt. Der Gehalt an isolierter Gesamt-RNA wurde durch eine photometrische Messung bestimmt.

### **2.5.2 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration**

RNA zeigt bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm ein Absorptionsmaximum, das genutzt wurde, um die Konzentration der entsprechenden RNA-Lösung photometrisch (Smartspec 3000, Biorad) zu bestimmen. Zur Bestimmung der Konzentration wurde die Lösung mit TE (Tris, EDTA, 10:1; pH 7,4) so verdünnt, dass die Extinktion der Lösung bei  $\lambda = 260$  nm im linearen Bereich (OD = 0,2 - 1,0) gemessen werden konnte. Als Nullkontrolle wurde das Lösungsmittel eingesetzt. Nach der Messung der optischen Dichte konnte die Konzentration der Lösung bestimmt werden. Für Einzelstrang-RNA (ssRNA) gilt, dass eine OD von 1,0 einer Konzentration von 40 µg/ml entspricht. Des Weiteren konnte die Reinheit der Proben ermittelt werden, indem über die Extinktion bei  $\lambda = 280$  nm der Proteinanteil bestimmt wurde; der Quotient OD 260/280 gilt als Maß für die Reinheit der RNA-Probe. Eine zusätzliche Überprüfung der RNA-Qualität erfolgte anhand einer Gelelektrophorese (s. 2.5.5), die die Auftrennung der ribosomalen RNA in die 18- und 28-S-Untereinheiten erlaubte und so eventuellen Degradierungen durch RNAsen offen legte.



### 2.5.3 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA erfolgte mit dem cDNA-Synthese-System von GIBCO BRL (Invitrogen).

Der Anteil der mRNA an der gesamten zellulären RNA beträgt ca. 1-2 %; selektiv wurde mRNA durch den Einsatz von Oligo-(dT)<sub>12-18</sub>-Primern zu cDNA revers transkribiert. Die Oligo-(dT)<sub>12-18</sub>-Primer binden an das 3'-PolyA-Ende der mRNA, so dass komplementär zur mRNA mittels M-MLV Reverser Transkriptase (*Moloney Murine Leukemia Virus* RNA-abhängige DNA-Polymerase) einzelsträngige cDNA synthetisiert wurde.

*dNTP* Mischung aus den vier Nucleotiden (dNTPs): Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP), Desoxythymidin-5'-triphosphat (dTTP), Desoxyguanidin-5'-triphosphat (dGTP) und Desoxycytidin-5'-triphosphat (dCTP)

*DEPC-Wasser* Wasser das zweimal unter Zugabe von 0,1% DEPC (Diethyl-Pyrocbonat) autoklaviert wurde, um RNase zu entfernen.

Zur cDNA-Synthese wurden 10 µg Gesamt-RNA in 10 µl DEPC-H<sub>2</sub>O eingesetzt, mit 1 µl Oligo-(dT)<sub>12-18</sub> (0,5 µg/µl) versetzt und für 10 min bei 72°C denaturiert. Nach der Denaturierung wurde der Reaktionsansatz auf Eis abgekühlt und mit 4µl 5x Puffer (0,25 mol/l Tris-HCl, pH 8,3; 0,375 mol/l KCl; 15 mmol/l MgCl<sub>2</sub>), 2 µl 0,1 mol/l DTT (Dithiothreitol), 1 µl dNTP (je 10 mmol/l) versetzt; zusätzlich wurde 0,4 µl RNase Inhibitor (16 U, RNasin, Promega, Madison, WI, USA) zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 2 min bei 37°C wurde dem Reaktionsansatz 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase zugesetzt und weitere 60 min bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 40 µl TE (Tris, EDTA, 10:1, pH 7,4) wurde das Enzym für 10 min bei 92°C inaktiviert und die Probe bis zum Gebrauch bei -20°C aufbewahrt.

### 2.5.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Der Polymerase-Kettenreaktion liegt die spezifische Bindung und Verlängerung zweier der zu amplifizierenden DNA oder cDNA komplementären Oligonukleotid-Primer zugrunde (s. Tab.2.2). Diese Primer flankieren am 5'- und 3'- Ende den zu

amplifizierenden DNA-Bereich. Nach der Denaturierung der DNA hybridisiert jeder Primer mit je einem der beiden DNA-Stränge. In der anschließenden DNA-Synthese durch die thermostabile Taq-Polymerase (isoliert aus *Thermus aquaticus*, Invitrogen) werden die Primer anhand der komplementären cDNA-Matrize verlängert, wobei die Syntheserichtungen der beiden Primer gegeneinander gerichtet sind.

Diese drei Schritte - Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Primer und DNA-Synthese - stellen einen PCR-Zyklus dar. Durch Wiederholung der Zyklen wird eine exponentielle Amplifikation des durch Primer flankierten DNA-Abschnitts erzielt, wobei stumpfe DNA-Enden oder Einzel-3'-A-Überhänge erzeugt werden.

**Tabelle 2.2:** Primersequenzen (Lauber, 1998; \*Effah Kaufmann et al., 2000), Temperatur für die Anlagerung der Primer an die cDNA (Hybridisierungstemperaturen) und cDNA-Größe der mit RT-PCR untersuchten Gene.

zu amplifizierendes Gen	Primersequenz	Hybridisierungs- temperatur	cDNA
GAPDH 3' GAPDH 5'	TGC CAT CAA CGA CCC CTT CAT T CCT CGG CCG GCT TCA C	52°C	710 bp
Osteocalcin 3' Osteocalcin 5'	CTA TTC ACC ACC TTA CTG CCC CTG CAT TCT GCC TCT CTG AC	47°C	340 bp
Osteonectin 3' Osteonectin 5'	TGC CAG TGG ACA GGG AAG AT AGA CGG AAG CTG CAG AAG AGA T	52°C	637 bp
Osteopontin 3' Osteopontin 5'	TTT GCC TGC CTC TAC ATA CAT TTT ACA TCA GAG CCA CGA GTT TCA CA	50°C	423 bp
*BSP 3' *BSP 5'	CCA TCT CCA TTT TCT TCC CTG CTT TAA TCT G	55°C	211 bp
*Kollagen I 3' *Kollagen I 5'	CAC ACA AAG ACA AGA ACG AG CAA CAA ATC CCC ACA CAC	52°C	198 bp

Als RT-PCR-Reaktionsansatz wurde pro PCR-Reaktion mindestens 1 µl cDNA in einem Gesamtvolumen von 10 µl in DEPC-Wasser vorgelegt. Dazu wurde in einem PCR-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) 10 µl Mix gegeben.

Der Mix für 8 Reaktionen bestand aus:

5x PCR-Puffer	18 $\mu$ l
25 mM MgCl <sub>2</sub>	18 $\mu$ l
dNTP (je 25 mM)	3,6 $\mu$ l
Primer	9 $\mu$ l
Taq-Polymerase	1 $\mu$ l

Das Gesamtvolumen eines Ansatzes lag bei 20  $\mu$ l und war bis zur Reaktion auf Eis zu lagern.

Die Reaktion bestand aus einer Denaturierung bei 92°C, einer Primerhybridisierung bei einer für den Primer spezifischen Temperatur ( $T_{Hybr.}$ ) und einer DNA-Synthesereaktion bei 72°C für jeweils 30 s. Dieser Zyklus wurde insgesamt 35 mal wiederholt. Den Amplifikationszyklen ging eine Denaturierungsphase von 2 min bei 92°C voraus, um eine vollständige Denaturierung der Ausgangs-DNA zu gewährleisten. Abschließend wurde der Ansatz für 7 min bei 72°C belassen, um nicht vollständig synthetisierte DNA-Fragmente zu komplettieren.

Der Temperaturverlauf der durchgeführten PCR-Reaktion:

92°C	7 min	1 Zyklus
92°C	30 s	35 Zyklen
$X^{\circ}\text{C}(T_{hybr.})$	30 s	35 Zyklen
72°C	30 s	35 Zyklen
72°C	7 min	1 Zyklus

Die Analyse der PCR-Reaktion erfolgte auf einem 1,7%igem Agarosegel.

### 2.5.5 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Zur Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten verschiedener Größe wurden Agarosegele in einer Konzentration von 1,7% für die Auftrennung von DNA und von 1,0% für RNA eingesetzt. Dafür wurde Agarose (Serva, Heidelberg) durch Kochen in 100 ml 1x TAE-Laufpuffer (400 mM Tris-Acetate; 20 mM EDTA; pH 8,0) gelöst und Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5  $\mu$ g/ml hinzugegeben. Die warme Agarose wurde in eine entsprechende Gelkammer (Invitrogen) gegeben. Nach dem Erkalten des Gels bzw. der Ausbildung der Gelmatrix wurde die Elektrophoreseapparatur (Pharmacia LKB, Freiburg) mit TAE-Laufpuffer gefüllt, so dass das Gel mit Laufpuffer bedeckt war. Die Proben wurden mit 1/5 Vol. 5x

Auftragspuffer und 3/5 TAE-Laufpuffer versetzt und in die Geltaschen gegeben. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht photographisch dokumentiert; hierbei können DNA-Fragmente ab ca. 20 ng visuell wahrgenommen werden.

## **2.6 Arbeiten mit dem Bioreaktor**

### **2.6.1 Verwendete Trägermaterialien**

#### *2.6.1.1 Osteofoam*

Osteofoam (BoneTec, Toronto, Kanada) besteht aus dem Copolymer Poly-lactid-glycolid, mit einem Monomeranteil von 75% Milchsäure und 25% Glycolsäure. Die Porosität der Trägergerüste liegt knapp über 90%. Seine Porenstruktur ist durchgängig interkonnektierend. Der Porendurchmesser liegt zwischen 800 und 1500  $\mu\text{m}$ , die interkonnektierenden Kanäle haben einen Durchmesser von ca. 350  $\mu\text{m}$  (Holy et al. 1999). Die zylindrischen Trägergerüste haben ein Gesamtvolumen von 0,75  $\text{cm}^3$  und eine Höhe von 1 cm.

Die Trägergerüste wurden steril verpackt von der Firma BoneTec geliefert. Zur Vorbereitung auf die Besiedlung wurden sie einmal mit sterilfiltriertem Ethanol p.A. (100%) für 1 min behandelt. Danach folgten drei Waschschrte mit sterilfiltriertem 70%-igem Ethanol für je 10 min. Das Ethanol wurde durch dreimaliges Spülen mit PBS entfernt. Der Träger wurde dann über Nacht in Kulturmedium im Brutschrank (Kendro) bei 37°C und 12,5%  $\text{CO}_2$  inkubiert.

#### *2.6.1.2 Camceram*

Camceram (Camimplants, Leiden, NL) besteht zu etwa gleichen Teilen aus  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP) und Hydroxylapatit (HA). Die Porosität des recht brüchigen Keramikmaterials liegt bei etwa 90%. Die sphärischen Poren haben einen Durchmesser zwischen 200 und 500  $\mu\text{m}$ . Der Durchmesser der interkonnektierenden Kanäle liegt unter 150  $\mu\text{m}$ . Die kubischen Trägergerüste haben eine Höhe von 1 cm und ein Gesamtvolumen von 1  $\text{cm}^3$ . Sie wurden durch trockene Hitze (5h, 180°C) sterilisiert. Zur Vorbereitung auf die Besiedlung wurden die Träger denselben Schritten wie die Osteofoam-Träger (s. 2.6.1.1) unterzogen.

### 2.6.1.3 Vitoss

Vitoss (US Patent No. 5,939,039; Orthovita, Malvern, Pennsylvania, USA) bestehen aus  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP). Die Porosität des Materials liegt nach Herstellerangaben bei ca. 90%. Die Porengröße variiert zwischen 1 und 1000  $\mu\text{m}$ , eine durchgängige Interkonnektivität der Poren scheint auch durch die große Bandbreite der Porendurchmesser nicht gegeben zu sein. Die zylindrischen Trägergerüste haben eine Höhe von 1,5 cm und ein Gesamtvolumen von ca. 1,1  $\text{cm}^3$ . Die Trägergerüste wurden sterilverpackt geliefert. Zur Vorbereitung auf die Besiedlung wurden die Träger denselben Schritten wie die Osteofoam-Träger (s. 2.6.1.1) unterzogen.

### 2.6.2 Aufbau des Bioreaktors

Begasungsstation:	mcu 2000 (Meredos, Bovenden)
Steuerungssoftware:	mfs (Meredos)
Zufuhrpumpe:	HP-10, Schlauchpumpe (Meredos)
Erntepumpe:	Korrekturmittelpumpe (Meredos)
Umwälzpumpe:	HP-90, Schlauchpumpe (Meredos)
Waage:	Precisa 6200 (Dietikon, Schweiz)
Magnetrührer:	Variomag, Biomodul, Biosystem B (H&P, Oberschleißheim)

Die Arbeiten wurden mit der Laborfermentersteuerung mcu 2000 durchgeführt. Diese durch das Softwarepaket mfs (Meredos) gesteuerte Gasmischstation ermöglichte eine kontrollierte Mischung der vier Gase Stickstoff, Sauerstoff, Kohlendioxid und Luft. Die Gaseinstellung war sowohl manuell als auch geregelt über eine Sauerstoffelektrode (Meredos), die den gelöstsauerstoff im Medium des Kleinfermenters misst, möglich. Darüber hinaus erfolgte eine on-line-Messung der Temperatur, welche durch eine von einem Wasserbad (Köttermann) gespeiste Mantelheizung konstant gehalten wurde.

Die Steuerungssoftware mfs beinhaltet zudem die unabhängige Steuerung von maximal drei Pumpen (HP-10/90, Meredos) pro Fermenter über RS232-Schnittstellen. Zwei der eingesetzten Pumpen dienten dem kontinuierlichen Medienwechsel im Bioreaktor. Der Medienwechsel bei konstantem Füllstand wurde

über eine Füllstandssonde (Meredos) realisiert. Bei konstanter Zulaufgeschwindigkeit wurde dabei die Erntepumpe (Abb. 2.2, 1), die verbrauchtes Medium in ein Abfallgefäß abpumpt, durch den Kontakt der Füllstandssonde mit dem Medium aktiviert. Das Messprinzip der Füllstandssonde beruht auf dem temperatursensitiven Schluss eines Stromkreises bei Eintauchen der Füllstandssonde in das Kulturmedium (Abb. 2.2).

Die dritte Pumpe (Abb. 2.2, 3) wurde zur internen Umwälzung des Mediums durch das von einer Haltevorrichtung eingeschlossene Festbett verwendet. Das besiedelte dreidimensionale Trägergerüst bildete das Festbett, das durch die umgebende, passgenau angefertigte Haltevorrichtung vollständig mit Medium durchströmt wurde. Die Konvektion des Mediums im Fermenter wurde über einen steuerbaren Magnetrührer realisiert. Zur Messung von Mischzeitkinetiken durch einen Säureimpuls (s. 2.6.2.2) konnte ebenfalls eine pH-Elektrode (Meredos) implementiert werden.

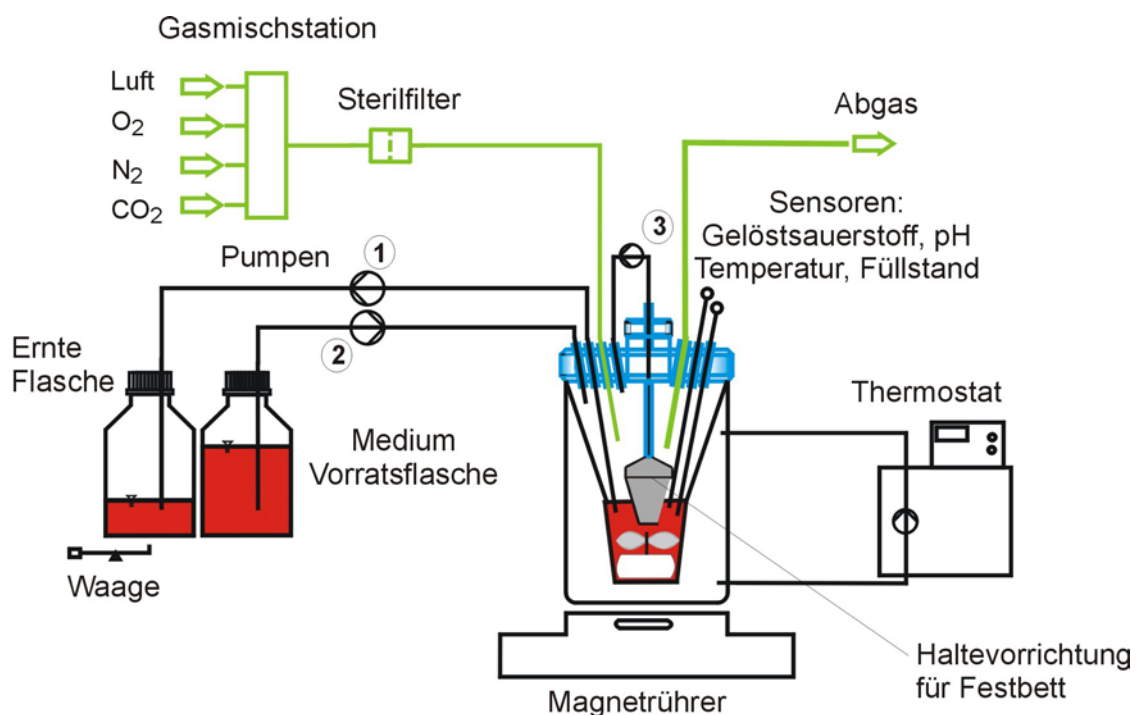


Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau einer Bioreaktor-Einfachstation in Perfusionsbetrieb.

### 2.6.2.1 Kulturführung mit dem Bioreaktor

Mit dem beschriebenen Bioreaktorsystem konnten mehrere Kulturführungsstrategien realisiert werden. Im einfachsten Fall wurde der Fermenter unter der Sterilwerkbank

zu Beginn der Fermentation mit Medium befüllt und mit dem dreidimensionalen Träger beladen. Die Kultur wurde dann ohne weiteren Medienaustausch im „Batch-Betrieb“ geführt. Dabei wurde die geregelte Begasung über die Gasmischstation mit Hilfe der Sauerstoffsonde realisiert. Die Versorgung des Festbettes mit Medium erfolgte über die interne Umwälzung.

Bei langfristiger Kultur (>5 Tage) war allerdings ein Medienaustausch essenziell. Dieser konnte entweder durch diskontinuierlichen Medienaustausch unter der Sterilwerkbank erfolgen. Dazu konnte der Fermentationsvorgang ohne Beeinflussung der Begasung angehalten und das gesamte Fermentergefäß unter der Sterilwerkbank geöffnet und das Medium ausgetauscht werden. Oder der Medienwechsel wurde kontinuierlich mit dem oben dargestellten Aufbau (Abb. 2.2) durchgeführt. Der kontinuierliche Medienaustausch wurde wie beschrieben durch das Zusammenspiel einer Zufuhr- und einer Erntepumpe sowie einer Füllstandssonde realisiert. Die Medienaustauschrate konnte dabei über die Pumprate der Zufuhrpumpe (Abb. 2.2, 2) gesteuert werden.

#### 2.6.2.2 Bestimmung der Mischzeitkinetik

Die Mischzeit in den Kleinformentern sollte im Allgemeinen keine kritische Größe sein, da die Zeit zur Verarbeitung der an die Zelle herangetragenen Stoffe wesentlich länger ist, als die Zeit, die zum Konzentrationsausgleich in der Nähe der Zellmembran benötigt wird. Die Ermittlung der Mischzeit lässt aber dennoch Rückschlüsse darauf zu, wie nah das Reaktorsystem dem idealen Mischzustand kommt. Diesen kennzeichnet beispielsweise der sofortige Konzentrationsausgleich eines an beliebiger Stelle zugeführten Spurstoffes. Im realen Fall wird die Endkonzentration jedoch erst nach einer endlichen Zeit erreicht. Ein übliches Verfahren besteht darin, die Zeit zu betrachten, zu der 90% des Endwertes erreicht ist. Bekannte Verfahren sind die Veränderung der Leitfähigkeit, der Temperatur oder des pH-Wertes. Gewählt wurde die pH-Wert-Methode. Sie ist einfach, schnell und genau, wenn man im Bereich von pH 7 bis pH 4 unter Säurezugabe arbeitet. Die Messung erfolgt durch Einspritzen einer definierten Menge HCl. Die zeitabhängige Veränderung des pH-Wertes wurde mit einer pH-Elektrode (Meredos) ermittelt. Der Wert für  $t_{90}$  lässt sich hieraus aber nicht direkt ablesen, da der pH-Wert ein logarithmisches Maß der Wasserstoffionenkonzentration  $c_{H^+}$  ist. Der pH-Wert muss zunächst in die Wasserstoffionenkonzentration umgerechnet werden.

$$c_{H^+} = 10^{-pH} \quad (6)$$

Mit dem Anfangswert (Index A) und dem Endwert (Index E) erhält man die bezogene Wasserstoffkonzentration  $\theta$ .

$$\theta = \frac{c_{H^+} - c_{H^+,A}}{c_{H^+,E} - c_{H^+,A}} \quad (7)$$

Trägt man  $\theta$  über die Zeit auf, entspricht die Mischzeit der Zeitspanne zwischen Startzeitpunkt und dem Zeitpunkt des Erreichens von  $\theta = 0,90$ . Um sicher zu gehen, dass bei der Messung die Zeitkonstanten der Elektrode zu vernachlässigen ist, wurde diese durch einen pH-Sprung zwischen pH 4 und 7 getestet (Vorlop, 1990). Die erhaltene Zeitkonstante liegt bei 3 s.

#### 2.6.2.3 Bestimmung des Sauerstoffübergangs

Die Begasung des Zellkulturmediums im Bioreaktor erfolgte über den Kopfraum des Fermentationsgefäßes. Die Kontrolle des Gehaltes an gelöstsauerstoff ( $pO_2$ ) wurde mittels eine Sauerstoffsonde (Meredos), die im Medium auf Höhe des Festbettes im Reaktorgefäß fixiert ist, durchgeführt. Das Messprinzip der Elektrode beruht auf dem Schluss eines Stromkreises über einen Elektrolyten zwischen Pt-Kathode und Ag-Anode der Elektrode. Durch eine Messverstärker wird an der Kathode eine konstante Polarisierungsspannung (550-750 mV) angelegt, die zur Oxidation des im Elektrolyten gelösten Sauerstoffes an der Anode und zur Reduktion an der Kathode führt. Die entstandene Stromstärke wird von dem Messverstärker aufgenommen und als Messwert an die Steuerungssoftware mfs ausgegeben.

Zur Kalibrierung der Sauerstoffelektrode wurde der Fermenter zunächst ohne Medium mit einem definierten Volumenstrom  $N_2$  begast. Nach Einstellung eines konstanten Wertes wurde die ausgegebene Stromstärke mittels der Steuerungssoftware gleich einer Luftsättigung von 0% gesetzt. Nach Befüllen des Bioreaktors mit Medium wurde das Kulturmedium mit 100% Luft desselben Volumenstroms begast. Nach erneuter Einstellung eines konstanten Wertes, wurde dieser einer Luftsättigung von 100% gleichgesetzt.



Zur Bestimmung der Geschwindigkeit des Gasaustausches wurde das Medium danach wiederum mit einem Volumenstrom 100% N<sub>2</sub> beaufschlagt und die Zeitspanne, in der der Wert der Luftsättigung auf 20% abgenommen hat, festgehalten.

Die Zeitkonstante der Elektrode wurde vor Versuchsbeginn in einer separaten Messung durch Überführung der Elektrode aus einer luftgesättigten in eine Atmosphäre reinen Stickstoffes festgehalten. Eine funktionstüchtige Elektrode ist dadurch gekennzeichnet, dass der Wert der Luftsättigung dabei in unter 60 s von 100% auf unter 2% fällt.

### 3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

#### 3.1 Standardisierung des Rattenmodells

##### 3.1.1 Primärzellisolation und Subkultivierung

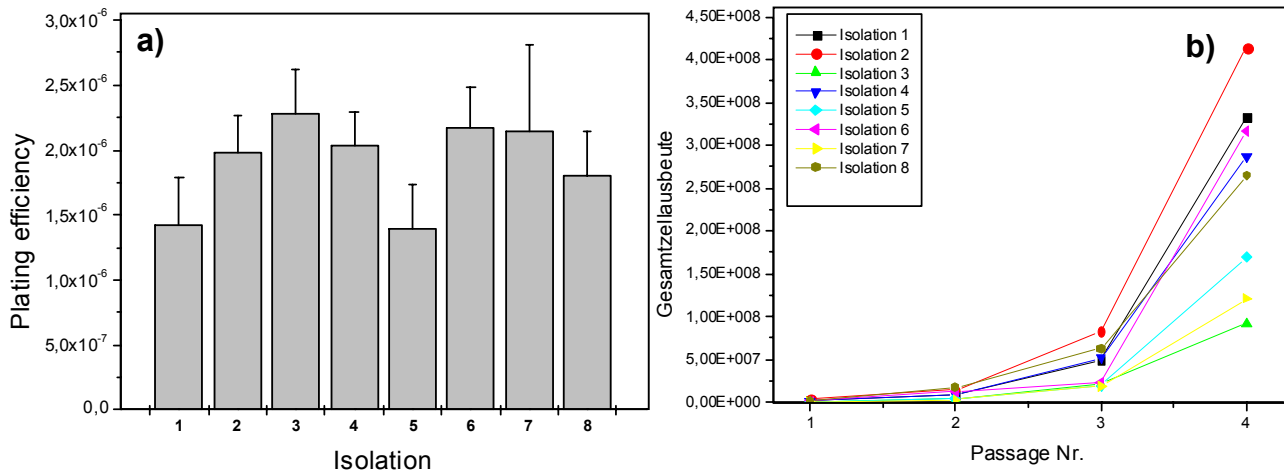
Im Verlauf der Arbeit wurden 17 Isolationen mit je vier bis sechs weiblichen Ratten des Stammes Wistar WKY durchgeführt. Das Alter der Tiere betrug zwischen 5 und 6 Wochen. Acht Isolationen wurden unter exakt identischen Kulturbedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden in FBS-haltigem Zellkulturmedium mit osteogenen Supplementen (ZKT-I, Pen/Strep, 15% FBS, L-Ascorbat-2-Phosphat,  $\beta$ -Glycerophosphat, Dexamethason) isoliert. Medienwechsel und Subkultivierung der Zellen wurde bei allen Isolationen an denselben Tagen durchgeführt.

Zur Beurteilung der nachfolgenden Daten wurde zunächst ein statistischer Vergleich hinsichtlich der *Plating Efficiency* und der Entwicklung der Verdopplungszeit zwischen den einzelnen Isolationen durchgeführt. Unter der *Plating Efficiency* wird hier die erreichte Ausbeute an Kolonien bezogen auf die ursprünglich ausplattierte Zellzahl nach der Isolation der Zellen aus dem Knochenmark verstanden.

Zahl der Kolonien / Gesamtzellzahl (Tag 0) = Plating Efficiency

Dazu wurde am Tag der Isolation (Tag 0) die Gesamtzellzahl und an Tag 5 nach Isolation die Anzahl der Kolonien auf allen besiedelten Zellkulturflaschen bestimmt.

Der mittlere Fehler der Plating Efficiency (Abb. 3.1 a) ergab sich aus den Abweichungen zwischen den einzeln ausgezählten Zellkulturflaschen ( $n > 8$ ). Die durchschnittliche mittlere Abweichung der Einzelisolationen lag bei 19,7%. Die mittlere Abweichung zwischen den Mittelwerten der acht aufgeführten Isolationsexperimente lag mit 16,7% sogar leicht unterhalb der Abweichungen in einer Einzelisolation.



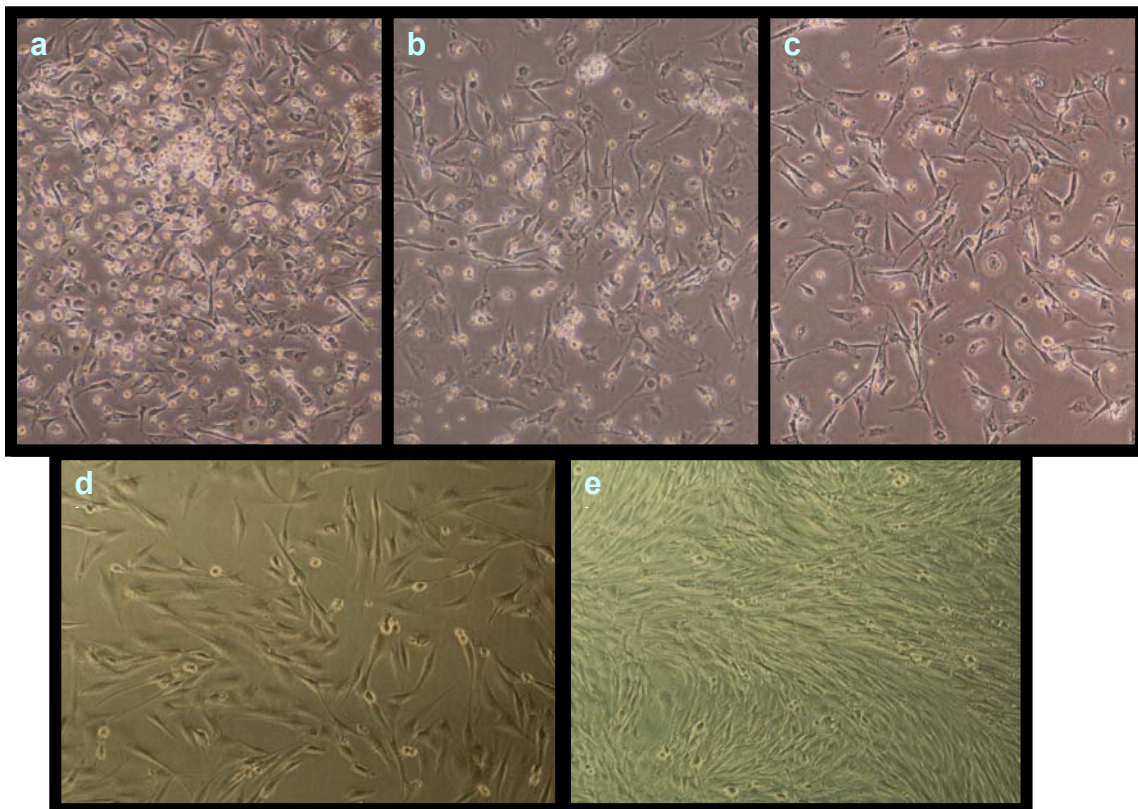
**Abbildung 3.1:** a) Vergleich der *Plating Efficiency* und b) der passagenabhängigen Zellzahlentwicklung bei unterschiedlichen Isolationen.

Die Ausbeute an *Colony forming units – Fibroblasts* (CFU-Fs), die die Ausgangspopulation für die osteogene Zellkultur bilden, kann demzufolge mit der etablierten Isolationsmethode mit guter Reproduzierbarkeit erreicht werden. Die absoluten Werte der berechneten *Plating Efficiency* ergeben, dass die Konzentration der CFU-Fs in der Ausgangspopulation im Mittel bei einer Zelle pro 500.000 Zellen liegt. Die Konzentration von mesenchymalen Stammzellen im Knochenmark wird allgemein etwa mit einer Zelle pro 100.000 Zellen angenommen (Prockop, 1997). Die Diskrepanz zwischen beiden Daten lässt sich dadurch erklären, dass sich bei der gewählten Isolationsmethode in der Primärkultur neben Zellen des Knochenmarks zusätzlich ein großer Anteil von verunreinigenden Zellen (z.B. Erythrozyten) befinden, die die Gesamtzellzahl bei der Isolation deutlich erhöhten, aber größtenteils bereits nach dem ersten Medienwechsel entfernt wurden.

Die Gesamtzellausbeute (Abb. 3.1 b) weicht dagegen in den einzelnen Passagen isolationsbedingt z.T. erheblich ab. Die mittlere prozentuale Abweichung lag je nach Passage zwischen 40 und 60%. Die Isolationen 1, 4, 6 und 8 zeigten dabei in der Endausbeute gut vergleichbare Daten mit Werten über  $2,5 \cdot 10^8$  Zellen. Die Isolationen 5 und 7 zeigten dagegen deutlich schlechtere Ausbeuten, ohne dass Unterschiede in der Kulturführung zur Begründung herangezogen werden könnten. Es zeigt sich lediglich, dass beide Isolationen bereits bei der ersten Passage unterdurchschnittliche Zellausbeuten lieferten. Isolation 3 erfolgte aus nur 4 Ratten, im Gegensatz zu den anderen Isolationen, bei denen 6 Ratten verwendet wurden. Dennoch handelte es sich bei Isolation 3 um eine unterdurchschnittliche

Isolationsausbeute, da die Endausbeute mit  $9,2 \cdot 10^7$  Zellen deutlich unterhalb der durch die verminderte Tieranzahl zu begründenden  $2/3$  der Durchschnittsausbeute lag.

Im Vergleich mit den erzielten *Plating Efficiencies* der drei schwächeren Isolate 3, 5 und 7 ließ sich allerdings keine deutliche Abhängigkeit hinsichtlich einer ebenfalls verminderten Koloniewasbeute erkennen. Bei der Subkultivierung wurde durchgehend eine Ausplattierdichte von 5.000 Zellen/cm<sup>2</sup> gewählt, da sich diese in Vorversuchen als am besten geeignet erwiesen hatte. Das Passagieren der primären Zellen wurde im Zuge der Standardisierung des Verfahrens immer an denselben Tagen nach der Isolation (Tag 0) durchgeführt: 1. Passage: Tag 5; 2. Passage: Tag 11; 3. Passage: Tag 17; 4. Passage: Tag 22.

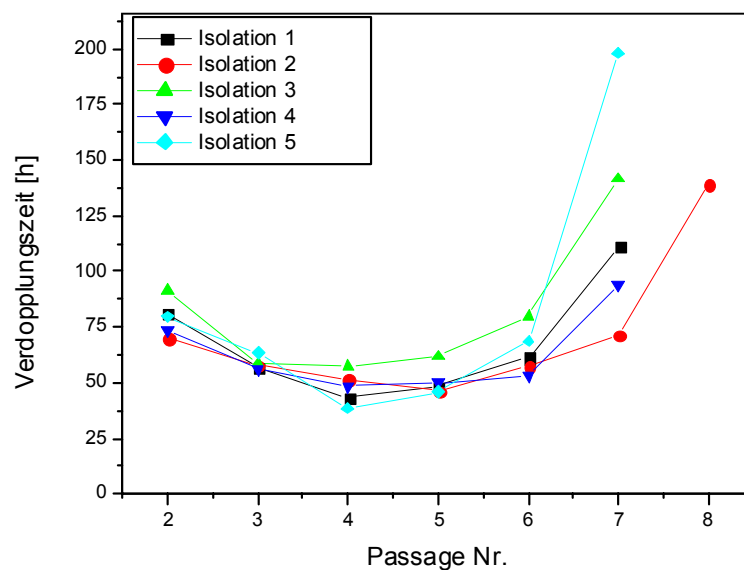


**Abbildung 3.2:** Morphologie und Reinheit der Zellen mit zunehmender Subkultivierung: a) Primärkultur, 5 Tage nach Isolation; b) 1. Passage, Tag 9 nach Isolation; c) 2. Passage, Tag 14 nach Isolation; d) 3. Passage, Tag 20 nach Isolation; e) 4. Passage, konfluent, 27 Tage nach Isolation.

Zur Verbesserung der Zellausbeute bei schwächer wachsenden Kulturen, kann es sich allerdings als sinnvoll erweisen, die Zeitpunkte der Subkultivierung um 24h zu verzögern.

Die Kolonien der Primärkultur waren trotz Mediumwechsel und mehrfacher Waschschrirte relativ stark durch Zellen nicht mesenchymalen Ursprungs verunreinigt

(s. Abb. 3.2a, abgerundete Zellen). Wie von Friedenstein et al. (1976) beschrieben wurde die Reinheit der Kultur mit zunehmender Passagenzahl deutlich erhöht. Nach der Subkultivierung adhärierten viele Zellen der hämatopoetischen Linie nicht wieder und konnten beim nächsten Mediumwechsel aus der Kultur entfernt werden. Nach der dritten Passage wurde auf diese Weise eine akzeptable Reinheit der Kultur erreicht. Die Zellen zeigten die spindelförmige Morphologie mesenchymaler Vorläuferzellen (s. Abb. 3.2d) und bei Konfluenz die „straßenförmige“ Strukturierung des Zellmonolayers (s. Abb 3.2e; Owen et al. 1990).

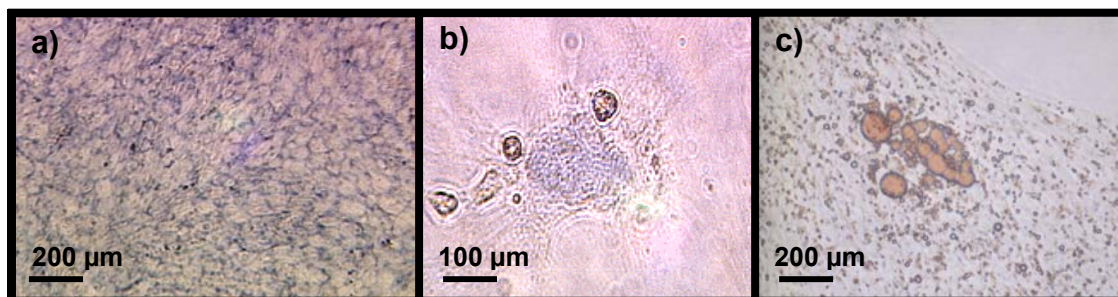


**Abbildung 3.3:** Entwicklung der Verdopplungszeit mit zunehmender Passagenzahl bei primären osteogenen Zellen der Ratte.

Im Zuge der Etablierung und Standardisierung des Rattenprimärzellmodells wurde auch die maximale Vermehrbarkeit der Zellen durch Subkultivierung untersucht. Als Parameter für die proliferative Kapazität wurde dabei die Verdopplungszeit rechnerisch bestimmt (s. 2.1.2.5). Die Verdopplungszeit konnte erst ab der 2. Passage bestimmt werden, da die Ausgangszellzahl bekannt sein musste und die nach der Isolation bestimmte Zellzahl auch alle nicht adhärenen Zellen mit einschließt. Die Verdopplungszeiten sanken bis zur 4. Passage mit zunehmender Passagenzahl. Danach konnte die minimale Verdopplungszeit von durchschnittlich ca. 50 h bestenfalls gehalten werden. Nach der 6. Passage nahm die proliferative Kapazität der Zellen stark ab und die Verdopplungszeit stieg deutlich an. Hierbei ist zu beachten, dass die Zellen bei Weitem kein exponentielles Wachstum - wie für die Berechnung vorausgesetzt – mehr zeigten. Die hohen Verdopplungszeiten zu Beginn

der Subkultivierung sind mit dem noch fortschreitenden Prozess der Abtrennung von nicht mesenchymalen Zellen zu begründen. Dadurch ist die als Ausplattierdichte ( $c_0$ ) in der auszusäenden Zellsuspension bestimmte Zellzahl höher als die Anzahl tatsächlich adhätierender Zellen, da nicht-mesenchymale Zellen aufgrund der für sie wenig geeigneten Kulturbedingungen nach dem Passagieren nicht erneut adhätieren und beim nächsten Mediumwechsel aus der Kultur entfernt werden. In der Literatur finden sich für Primärkulturen aus Calvarien 21 Tage alter Rattenföten unter ähnlichen Kulturbedingungen vergleichbare Daten. Eine Ausgangszelldichte von  $3,6 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>, eine Kulturdauer von 7 Tagen und eine erreichte Zelldichte von  $3 \cdot 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> ergäbe bei der eingesetzten Berechnungsmethode eine Verdopplungszeit von ca. 54 Stunden (Owen et al., 1990).

Ausgehend von den aus den Abbildungen 3.1-3.3 ersichtlichen Daten wurde die Entscheidung getroffen, die weitergehenden Versuche mit Zellen der 4. Passage durchzuführen. Dafür sprachen folgende Argumente: wie Abbildung 3.2 zeigt, war der Aufreinigungsprozess mittels differentieller Adhäsion bereits nach der zweiten Passage weitgehend abgeschlossen. Die Reinheit der 4. Kultur sollte demnach ausreichend sein. Die Zellen der 4. Passage befanden sich darüber hinaus auf dem Niveau höchster proliferativer Aktivität (Abb. 3.3), während Zellen der 6. Passage in manchen Fällen nicht einmal mehr die Konfluenz erreichten. Ausschlaggebend ist des Weiteren, dass mit einer Gesamtzellausbeute von etwa  $1 \cdot 10^8$  bis  $3 \cdot 10^8$  Zellen pro Isolation eine ausreichend große Zellausbeute zur Besiedlung von zahlreichen Trägergerüsten oder Kulturflaschen erzielt wurde. Die Zellen konnten nach der zweiten Passage kryokonserviert werden. Dabei wurden die Zellen in einer Konzentration von  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen/Kryoröhrchen eingefroren und beim Auftauvorgang auf einer Fläche von 175 cm<sup>2</sup> wieder ausgesät.



**Abbildung 3.4:** Multipotenz der Kultur: a) Färbung der Alkalischen Phosphatase mit NBT/BCIP; b) Alcian Blue-Färbung auf Chondrozyten-spezifische ECM-Proteine; c.) Adipozyten gefärbt mit SudanIII.

Anders als Isolationsverfahren, die auf einem immunologischen Aufreinigungsverfahren fußen, wie beispielsweise das CD34<sup>+</sup>-Sorting von hämatopoetischen Stammzellen, lieferte das gewählte Aufreinigungsverfahren ausnahmslos Mischkulturen. Dass dennoch das beschriebene Verfahren gewählt wurde, hat mehrere Gründe. Zum einen sind im Gegensatz zum hämatopoetischen System keine speziesübergreifenden Oberflächenmarker für sehr frühe Osteoblastenvorläufer bekannt. Die ausschließlich für das humane System publizierten Antikörper wie Stro-1 sind darüber hinaus erst seit Januar 2003 kommerziell erhältlich (Simmons & Torok-Storb, 1991; Shi et al., 2002). Eine Negativ-Sortierung unter Verwendung von bekannten Oberflächenmarkern für hämatopoetische Zellen oder Endothelzellen wäre hingegen mit Ausbeuteeinbußen verbunden. Zwar würde die Reinheit der Kultur dadurch leicht verbessert, eine Mischkultur aber nicht verhindert. Denkbar wäre der Einsatz von Antikörpern gegen Markerproteine späterer Phasen der osteogenen Differenzierung wie Alkalischer Phosphatase. Allerdings erhält man hier nach der Aufreinigung eine Zellpopulation mit nur noch begrenztem proliferativen Potenzial (Herbertson & Aubin, 1997).

Ausschlaggebend für die Verwendbarkeit der isolierten Zellen ist letztendlich ihre Fähigkeit unter gegebenen Kulturbedingungen in knochenbauende Zellen zu differenzieren. Das hohe proliferative Potenzial der isolierten Zellen lässt vermuten, dass sich ein erheblicher Anteil der Primärkultur aus sehr frühen, möglicherweise multipotenten Stammzellen zusammensetzt. Zur Überprüfung dieser Fragestellung wurde in unterschiedlichen Kulturmedien die Entwicklung der Zellen der ersten Passage betrachtet (s. Abb. 3.4). Unter osteogenen Zellkulturbedingungen (ZKT-I, 15% FBS, Pen/Strep, L-Ascorbat-2-Phosphat,  $\beta$ -Glycerophosphat, Dexamethason, Medienwechsel alle 3 Tage) zeigten die Zellen 10 Tage nach Konfluenz nicht länger die spindelförmige Morphologie der mesenchymalen Vorläuferzellen, sondern ähnelten eher der kubischen Form des ausdifferenzierten Osteoblasten. Darüber hinaus zeigte die Färbung auf das membranständige Enzym Alkalische Phosphatase bei allen Zellen des Monolayers eine deutliche Reaktion (s. Abb. 3.4a).

Die Ausbildung eines chondrogenen Phänotyps war dagegen unter osteogenen Kulturbedingungen nicht zu beobachten. Alcian Blue Färbung auf chondrozyten-spezifische ECM-Proteine zeigten keine Reaktion. Die in Abb. 3.4b dargestellte leichte Blaufärbung als Reaktion auf eine Alcian Blue Färbung zeigten die Zellen nach zehntägiger Kultur mit 5 ng/ml TGF- $\beta$ 1 in ZKT-I mit 15% FBS und Pen/Strep.



Aber auch unter diesen chondrogenen Kulturbedingungen (Johnstone et al., 1998) konnten nur sehr vereinzelt Alcian Blue-positive Zellen gefunden werden.

Auch eine Fettzellbildung war bei osteogener Kulturführung nicht zu beobachten. Allerdings war diese durch Mediensupplemente und reduzierte Medienwechsel leicht zu induzieren (Guller et al., 1988). Durch eine Kulturführung mit glucosereichem, insulinhaltigem Medium mit einer hohen Dexamethasonkonzentration, (ZKT-I, 10%FBS, Pen/Strep, 10 µM Insulin, 1 µM Dexamethason) über einen Zeitraum von 10 Tagen, mit nur einem Mediumwechsel an Tag 7, konnte an vielen Stellen der Monolayerkultur das Auftreten von Fettzellen induziert werden (Abb. 3.4c).

Die Bildung von Adipozyten und Chondrozyten, welche durch Kulturbedingungen induziert werden konnte, deutete auf die Existenz von frühen Stammzellen mit Multipotenz hin. Allerdings ist die Differenzierbarkeit zu Chondrozyten und Adipozyten deutlich geringer als die in osteogener Richtung. Dies weist darauf hin, dass bereits die Zellen der ersten Passage zu einem Großteil ihre Multipotenz verloren und die Differenzierung in osteogener Richtung begonnen haben. Für eine Transdifferenzierung in die chondrogene oder adipozytäre Richtung waren die gewählten Kulturbedingungen möglicherweise auch bei frühen Knochenvorläuferzellen nicht ausreichend drastisch. Es muss davon ausgegangen werden, dass zu jedem Zeitpunkt der Kulturführung ein Gemisch verschieden weit fortgeschrittener Differenzierungszustände vorlag.

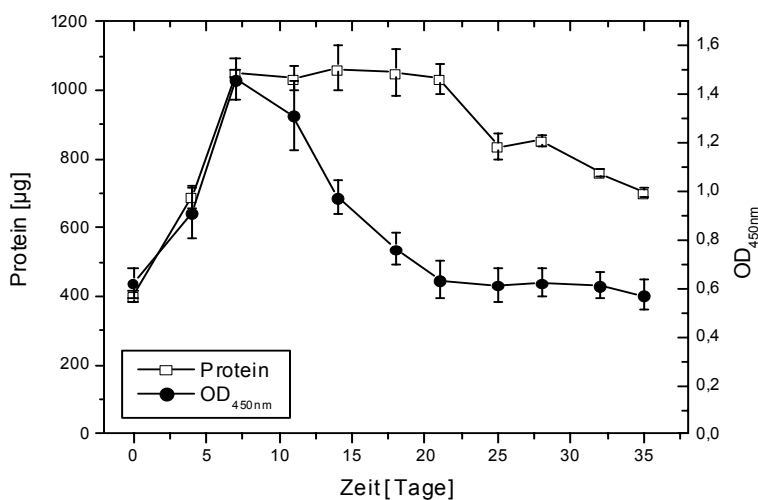
### 3.1.2 Zellcharakterisierung

Grundlegend für die weiteren Arbeiten mit den isolierten Zellen war eine umfangreiche Charakterisierung ihres Verhaltens hinsichtlich Proliferation und Differenzierung *in vitro*. Hierzu wurde zunächst das in der Literatur gängige Kultivierungsmodell gewählt. Die Zellen wurden in 12- und 48-Loch-Platten sowie T25- und T75-Zellkulturflaschen kultiviert. Als Medium wurde FBS-haltiges Zellkulturmedium mit osteogenen Supplementen und Antibiotika verwendet: ZKT-I, 15% FBS, Pen/Strep (100 I.E./ml / 100µg/ml), L-Ascorbat-2-Phosphat (0,2 mM), β-Glycerophosphat (10 mM) und Dexamethason (10 nM). Anstelle des verwendeten Basalmediums ZKT-I findet man in der Literatur zumeist MEM alpha (Herbertson & Aubin, 1997) oder DMEM-LG (Jaiswal, 1997). Bei der hohen FBS-Konzentration konnte allerdings in einem Vorversuch kein deutlicher Effekt auf Proliferation und Synthese der Alkalischen Phosphatase durch die Wahl des Basalmediums

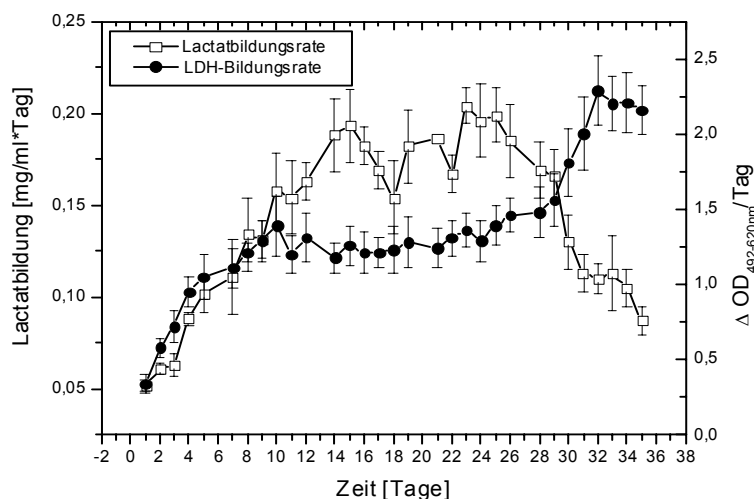


festgestellt werden. Erst nach Reduktion des FBS-Gehaltes wurden Unterschiede hinsichtlich der Proliferation zwischen den getesteten Basalmedien beobachtet. Hierbei erwiesen sich allerdings nicht die in der Literatur genannten Medien, sondern vielmehr McCoy's5a und ZKT-I als am besten geeignet (s. 3.2.1).

Es wurden osteogene Rattenzellen der vierten Passage über einen Kulturzeitraum von 35 Tagen untersucht. Die Zellen wurden in einer Dichte von 5.000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Die Kultur bildete nach 6 Tagen einen konfluenten Monolayer (Tag 0). Das Zellwachstum wurde mithilfe des Vitalitätstests WST-1 und der Proteinentwicklung beobachtet (Abb. 3.5). Zusätzlich wurde die Lactatbildungsrate und die Entwicklung der LDH-Konzentration im Medium bestimmt (Abb. 3.6). Die LDH-Konzentration konnte mit dem verwendeten Test nicht absolut bestimmt werden, daher wurde die tägliche Zunahme des Messwertes bezogen auf den Messwert des Vortages bestimmt. Bei der Proteinbestimmung mit dem Micro-BCA-Test wurde ein Drittel der Zellen einer T25-Flasche lysiert und so bei der nachfolgenden Analyse das gesamte zelluläre Protein erfasst. Zur Vitalitätsbestimmung wurden Triplikatbestimmungen in einer 48-Loch-Platte mit dem WST-1 Testsystem durchgeführt.



**Abbildung 3.5:** Zeitliche Entwicklung des Gesamtproteins und der Vitalität. Die Gesamtproteinbestimmung wurde mit dem Micro BCA-Testsystem durchgeführt. Die Vitalität der Zellen wurde mit dem WST-1-Test (OD 450 nm) bestimmt.



**Abbildung 3.6:** Zeitliche Entwicklung der Lactat- und LDH-Bildung. LDH und Lactat werden aus dem Medienüberstand bestimmt. Dazu wird je eine Medienprobe von 500 µl aus einer T25 und einer T75 entnommen. Der Mittelwert der getrennt analysierten Medienproben bildet den Messwert.

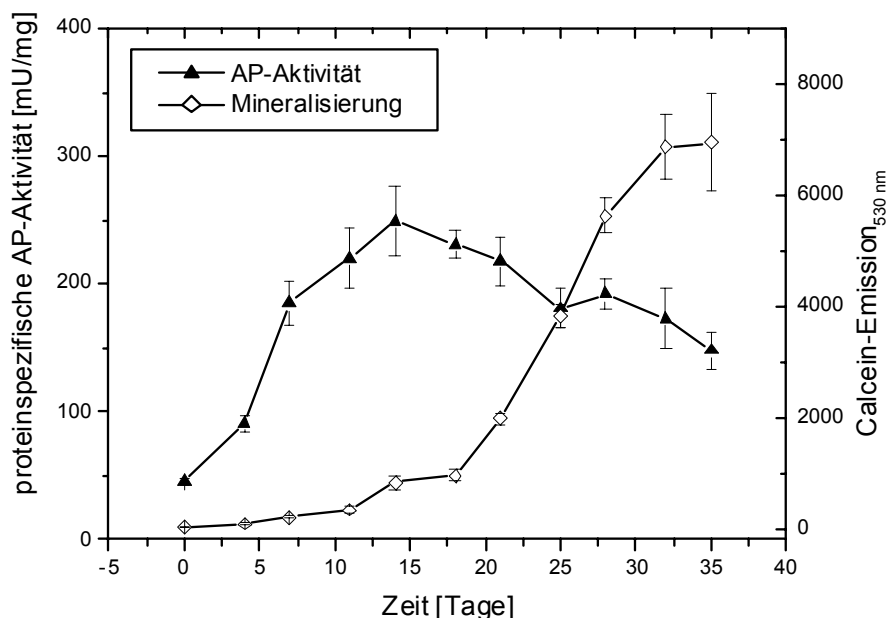
Zunächst glich der relative Anstieg der Vitalität der Gesamtproteinzunahme. Nach Tag 7 blieb die Vitalität allerdings nicht wie die Proteinmasse auf einem Plateau, sondern nahm wieder stetig bis etwa auf den Anfangswert ab (Abb. 3.5). Die Gesamtproteinmenge dagegen nahm erst nach Tag 21 wieder ab. Während die Bestimmung des Gesamtproteins also auf eine gleichbleibend hohe Zellzahl zwischen Tag 7 und Tag 21 hindeutete, ergab die Vitalitätsbestimmung mit WST-1 eine stetige Abnahme der Zellvitalität nach Tag 7. Die auch nach Tag 7 zunehmende Lactatbildungsrate (Abb. 3.6), die etwa an Tag 12 ein Plateau erreichte, unterstützte die durch die Proteinbestimmung gewonnenen Daten einer gleichbleibend hohen Zellkonzentration. Auch die LDH-Bestimmung ließ keine erhöhte Absterberate von Zellen nach Tag 7 erkennen. Vielmehr erreichte die LDH-Konzentration an Tag 8 bis 10 ebenfalls ein Plateau.

Eine Erklärung für die Abnahme des WST-1-Umsatzes bei gleichbleibender Zellzahl könnte in dem Messprinzip des verwendeten Tests liegen. Der Umsatz von WST-1 erfolgt durch mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen. Das Prinzip fußt daher auf einer gleichbleibenden Aktivität der Mitochondrien. Dies kann man bezugnehmend auf die Arbeiten von Komarova et al. (2000), die den Stoffwechsel von primären fötalen Rattencalvarienzellen untersucht haben, im Falle der Langzeitkultivierung von primären osteogenen Rattenzellen jedoch nicht als gewährleistet ansehen. Vielmehr teilen die Autoren die Proliferation und Differenzierung ebenfalls in drei metabolische Phasen ein: In der Proliferationsphase nimmt die mitochondriale gegenüber der glycolytischen Aktivität stark zu, während der Reifung der extrazellulären Matrix steigt der ATP-Gehalt der Zellen an, die mitochondriale Aktivität bleibt in dieser Phase hoch und mit Beginn der Mineralisierung erhöht sich die glycolytische Aktivität der Zellen und die mitochondriale nimmt ab. Möglicherweise ist der verminderte WST-1 Umsatz also durch eine fortschreitende Reduzierung der mitochondrialen Aktivität bei zunächst gleichbleibender Zellzahl zu erklären.

Ein Vergleich der Gesamtproteinbestimmung mit der Lactat- und LDH-Bestimmung im Medium zeigt, dass eine direkte Korrelation der medienanalytisch gewonnenen Daten mit der Zellzahl nur eingeschränkt möglich ist. Lactatbildungsrate und LDH-Konzentration im Medium nahmen im Verlauf der ersten Proliferationsphase der Gesamtproteinmenge vergleichbar zu. Während sich Proteinmasse und Lactatbildungsrate um den Faktor 2,5 erhöhten, nahm die LDH-Konzentration im

Medium in den ersten sieben Tagen etwa um den Faktor 3 zu. Während LDH und Gesamtproteinmenge zwischen dem siebten und zehnten Tag ein Plateau erreichten, erhöhte sich die Lactatbildungsrate noch bis Tag 14 weiter. Dies kann möglicherweise auf die erhöhte glykolytische Aktivität der Zellen der späteren Differenzierungsstadien zurückgeführt werden. Nach Tag 21 deuteten sowohl die Gesamtproteinmenge als auch Lactatbildungsrate und LDH-Konzentration auf eine Reduzierung der Zellzahl hin. Die steigende LDH-Konzentration zeigt eine erhöhte Zelllyse an. Ob die Ursache für das Absterben der Zellen Nekrose oder Apoptose war, lässt sich mit dem gewählten Nachweisverfahren nicht bestimmen. Es ist allerdings bekannt, dass etwa 65% der terminal differenzierten Osteoblasten nicht zu Osteozyten oder *Bone Lining Cells* weiterdifferenzieren, sondern der Apoptose unterliegen (Manolagas et al., 2000). Hierin könnte die Begründung für die erhöhten LDH-Konzentrationen und die Reduktion der Gesamtproteinmenge und der Lactatbildungsraten am Ende der Kultur liegen.

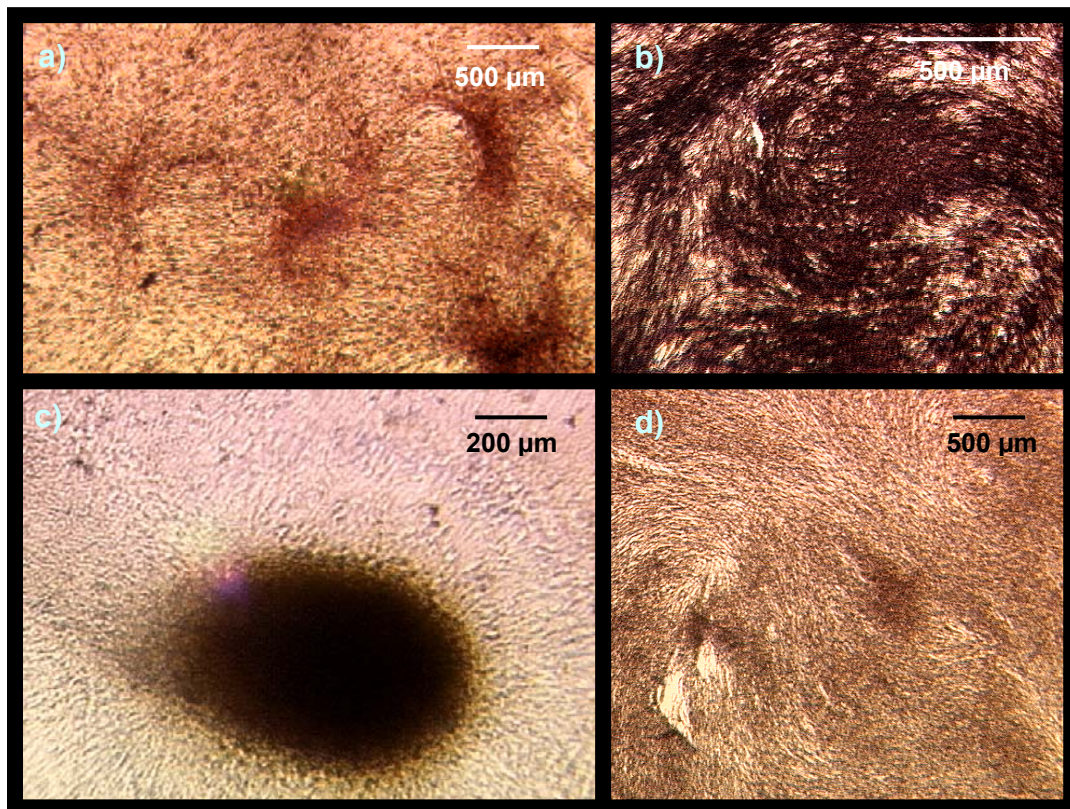
Die Bestimmung der Alkalischen Phosphatase (AP) erfolgte aus einem Drittel der Zellen einer T25-Zellkulturflasche. Der Nachweis der Mineralisierung wurde auf 12-Loch-Platten durch Färbung des extrazellulären Calciums mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein durchgeführt.



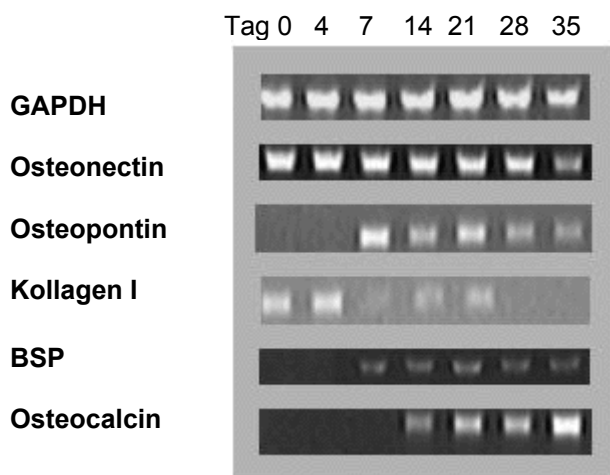
**Abbildung 3.7:** Zeitliche Entwicklung der proteinspezifischen Alkalischen Phosphatase und Mineralisierung. Während die proteinspezifische Alkalische Phosphatase als früher Marker der Osteogenese an Tag 14 bereits ihr Maximum erreicht, beginnt die Ablagerung des extrazellulären Calciums erst zwischen Tag 11 und 14 und erreicht erst nach Tag 30 eine Plateauphase.

Die proteinspezifische AP-Aktivität stieg bereits in der proliferativen Phase in den ersten sieben Tagen stark an. Das Maximum erreichte sie an Tag 15, danach begann eine langsame Abnahme der AP-Aktivität. Die Alkalische Phosphatase ist der prominenteste Marker der Osteogenese. Er wird häufig als transienter Marker für frühe Osteoprogenitoren bezeichnet (Owen et al. 1990), ist aber auch noch auf reifen Osteoblasten vertreten, nur auf Osteozyten ist seine Expression nicht feststellbar (Aubin, 1999). Die Enzymaktivität wurde hier proteinspezifisch angegeben, um den Einfluss der Zellzahlschwankung zu nivellieren. Die starke Expressionszunahme der proteinspezifischen AP-Aktivität zu Beginn der Kulturführung zeigt, dass auch in der vierten Passage noch ein gewisser Anteil von frühen Knochenvorläuferzellen vorliegt, der noch nicht oder nicht in maximalem Umfang AP exprimiert und unter den gegebenen Kulturbedingungen weiter differenziert. Die leichte Abnahme der proteinspezifischen AP-Aktivität nach Tag 14 zeigt, dass nach zweiwöchiger Kultur bereits reife Osteoblasten in das Stadium des Osteozyten überwechseln. Bei einer Kultur, die nicht aus einem Gemisch verschiedener Differenzierungszustände besteht, sollte man am Ende eine drastischere Abnahme der AP-Aktivität erwarten. Die vergleichsweise schwache Reduzierung zeigt, dass auch am Ende der Kulturführung noch reife Osteoblasten und möglicherweise auch frühere Differenzierungsstadien in der Kultur vorliegen. Die Einlagerung von Calciumphosphaten in die extrazelluläre Matrix als abschließender Schritt der Differenzierung beginnt in der vorliegenden Kultur ab Tag 14. Eine starke Zunahme der Mineralisierung ist allerdings erst ab Tag 21 zu verzeichnen.

Zur morphologischen Analyse und zur Absicherung der biochemischen Daten wurden die Kulturen auch histologisch untersucht (Abb. 3.8). Die Kollagenfärbung mit Direktrot (Abb. 3.8a) zeigt, dass die „*Nodule*-Strukturen“, die später mineralisiert wurden, bereits an Tag 8 in der Kollagenmatrix zu finden waren. Am Höhepunkt der AP-Aktivität an Tag 14 reagierten alle Zellen der Kultur mit intensiver Blauviolettffärbung auf die AP-Färbung mit NBT/BCIP (Abb. 3.8b). Die Mineralisierungsfärbung nach von Kossa, die durch elementares Silber hervorgerufen wird, zeigte, dass bereits nach 21 Tagen (Abb. 3.8 c) mineralisierte *Nodules* in der Kultur zu finden waren, während nach 30 Tagen (Abb. 3.8d) eine großflächige Mineralisierung zu erkennen war.



**Abbildung 3.8:** Histologische Färbungen osteogener Rattenzellen der 4. Passage: a) Direktrot-Färbung auf Kollagen an Tag 8. Rotfärbung zeigt Kollagen-positive Bereiche. b) Alkalische Phosphatase Färbung mit NBT/BCIP an Tag 14. Violett-schwarze Färbung zeigt AP-positive Bereiche c) von Kossa-Färbung auf Mineralisierungszonen an Tag 21 und d) an Tag 30. Braunschwarze Färbung weist auf extrazelluläres Calcium hin.



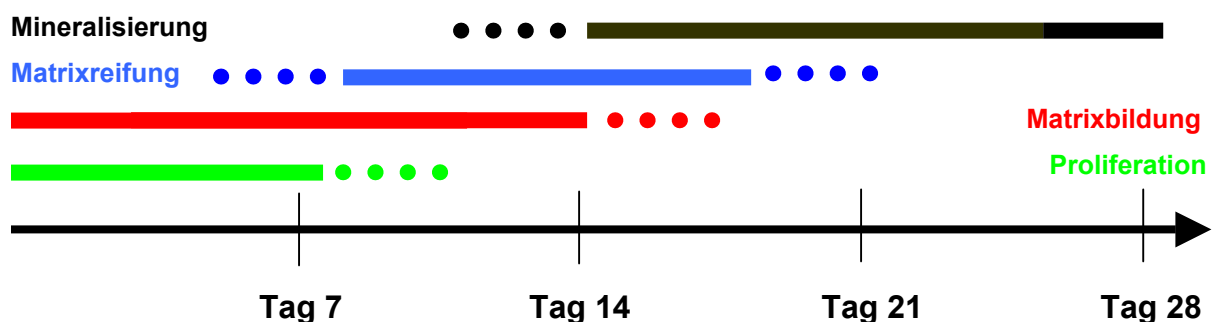
**Abbildung 3.9:** RT-PCR von Markergenen der Knochenzell-differenzierung von osteogenen Rattenzellen. Zur semi-quantitativen Bestimmung der Expressionshöhe erfolgt ein Abgleich der eingesetzten cDNA auf ein ubiquitär exprimiertes Stoffwechselgen, in diesem Falle Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAPDH). Die Bandenintensität zeigt, ob und wie stark das entsprechende Gen im untersuchten Zeitraum transkribiert wird.

Die RNA für die RT-PCR wurde aus den Zellen einer T75-Zellkulturflasche isoliert und revers in cDNA transkribiert. Eine semiquantitative Aussage über die Transkripte-bene der knochenspezifischen Gene wurde durch einen Abgleich der eingesetzten Menge cDNA mit dem Stoffwechselgen Glycerinaldehyd-3-Phosphat

(GAPDH) ermöglicht. Hierbei wurde in allen PCR-Reaktionen nur genau soviel cDNA eingesetzt, dass bei der GAPDH-PCR für alle Zeitpunkte eine stabile Bandenintensität vorhanden war. Osteonectin und Kollagen I konnten bereits an Tag 0 auf RNA-Ebene nachgewiesen werden. Osteonectin, das auch noch in reifen Osteoblasten nachgewiesen werden kann, war bis Tag 35 in den Zellen nachweisbar. Kollagen I dagegen konnte nur bis Tag 21 auf Transkriptebene nachgewiesen werden.

Osteopontin dessen Expression zeitlich nach der Expression von Kollagen I einzuordnen ist, konnte erst an Tag 7 auf RNA-Ebene nachgewiesen werden, damit also zu einem Zeitpunkt, an dem die proliferative Phase der Zellen weitgehend beendet war. Nach Literaturdaten (Zohar et al., 1997) sollte die Osteopontinbildung etwa gleichzeitig mit Osteonectin einsetzen. Das erste Auftreten von Osteopontin ging hier aber vielmehr einher mit dem von *Bone Sialo Protein* (BSP), das abgesehen von einer kurzen transienten Expression in frühen Knochenvorläuferzellen, die hier nicht nachgewiesen werden konnte, der Differenzierungsstufe des Präosteoblasten zugeordnet wird (Aubin, 1999). Das späte Markergen Osteocalcin (OC) konnte bereits ab Tag 14 auf Transkriptebene nachgewiesen werden. Die Expression dieses mit der Mineralisierung der ECM assoziierten Gens steigerte sich im Verlauf der weiteren Kultur bis hin zu Tag 35.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Kombination der eingesetzten analytischen Methoden eine umfassende Charakterisierung des Differenzierungszustandes der Kultur möglich macht. In Kenntnis aller Daten ist es möglich eine grundlegende Einteilung der Phasen der osteogenen Kultur nach Owen et al. (1990) in Proliferationsphase, Matrixbildung, Matrixreifung und Mineralisierung vorzunehmen (Abb. 3.10).



**Abbildung 3.10:** Einteilung der Proliferations- und Differenzierungsphasen für die Kultur primärer osteogener Rattenzellen der vierten Passage. Anfang und Ende der Phasen ist gepunktet dargestellt, um zu verdeutlichen, dass begründet durch die Mischung verschiedener Differenzierungszustände keine Phase einen definierten Anfangs- oder Endpunkt besitzt.

Aufgrund der Mischung aus verschiedenen Differenzierungsstadien kann es sich nicht um eine sequenzielle Abfolge von Differenzierungsphasen handeln, vielmehr sind die Übergänge fließend. Die Zellen der vierten Passage haben noch ausreichend proliferatives Potenzial, um auch nach dem Erreichen der Konfluenz die Proliferationsphase noch weitere 7 Tage fortzusetzen. Allerdings ist der Anteil an Präosteoblasten hoch genug, dass ab dem Tag der Konfluenz auch die Matrixbildung beginnt. Spätestens an Tag 7 beginnt dann mit der Expression der nicht-kollagenösen Matrixproteine Osteopontin und BSP die Matrixreifung. Die abschließende Phase der Differenzierung beginnt an Tag 14, worauf sowohl die Expression des Matrixproteins Osteocalcin in der RT-PCR als auch der fluoreszenzphotometrische Nachweis des extrazellulären Calciums mit Calcein hinweisen.

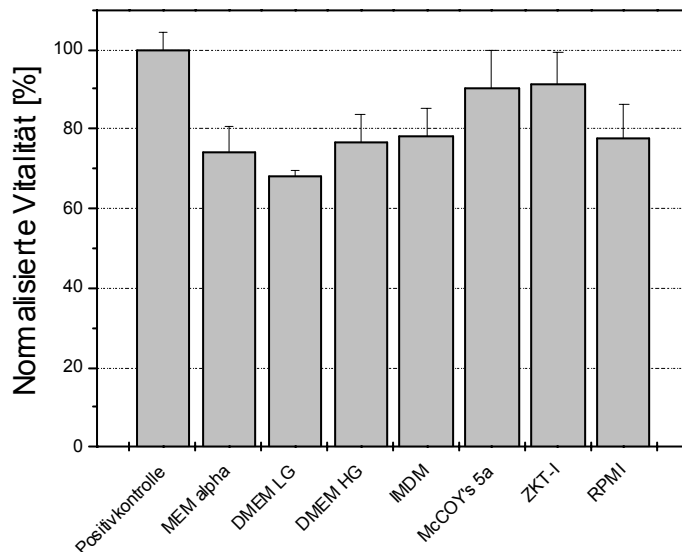
### ***3.2 Bestimmung eines geeigneten Kulturmediums***

Zur Kultivierung von primären tierischen und humanen Knochenvorläuferzellen wird derzeit überwiegend antibiotikahaltiges Basalmedium mit einem FBS-Anteil zwischen 10 und 15% verwendet. Selbst Zelllinien wie CH310T1/2, MC3T3-E1 und Saos-2 werden mit einem Serumanteil von mindestens 10% kultiviert. Darüber hinaus werden als osteogene Supplemente meist das Glucocorticoidhormon Dexamethason (10 -100 nM), L-Ascorbat-2-Phosphat (200 µM) und β-Glycerophosphat (10 mM) zugegeben. Der Einsatz eines definierten, serumfreien Mediums ist in Anbetracht des späteren klinischen Einsatzes von autologen Zellen dagegen wünschenswert.

#### **3.2.1 Basalmedien**

Zur Untersuchung des Einflusses der Basalmedien wurden Zellen der vierten Passage eingesetzt. Bis zur dritten Passage wurden die Zellen in MEM alpha, 15% FBS, mit Antibiotika und osteogenen Supplementen kultiviert. Drei Tage vor Testbeginn wurde der Serumgehalt sukzessiv durch täglichen Wechsel von 50% des Mediums auf unter 5% reduziert. Am Anfang des Tests wurden die Zellen in einer Dichte von 5000 Zellen/cm<sup>2</sup> auf 48-Lochplatten in den jeweiligen Basalmedien mit 5% FBS ausplattiert. Als Positivkontrolle wurde MEM alpha mit 15% FBS mitgeführt. Pro getestetem Medium wurden Zellen in 6 Vertiefungen ausplattiert. An Tag 3 erfolgte ein Mediumwechsel. An Tag 5 wurde die Vitalität der Zellen mit dem WST-1 Reagenz überprüft und die relativen Vitalitätsdaten bezogen auf die Positivkontrolle ermittelt. Der Versuch wurde zweimal mit Zellen aus unterschiedlichen Isolationen

durchgeführt und Mittelwerte und Standardabweichungen aus diesen beiden Messreihen ermittelt (Abb. 3.11).



**Abbildung 3.11:** Einfluss der Basalmedien auf die Proliferation. Die Basalmedien werden mit 5% FBS und Antibiotika versetzt. Als auf 100% normalisierte Positivkontrolle dient MEM alpha mit 15% FBS. Die relative Vitalität wird mit dem WST-1 Reagenz bestimmt.

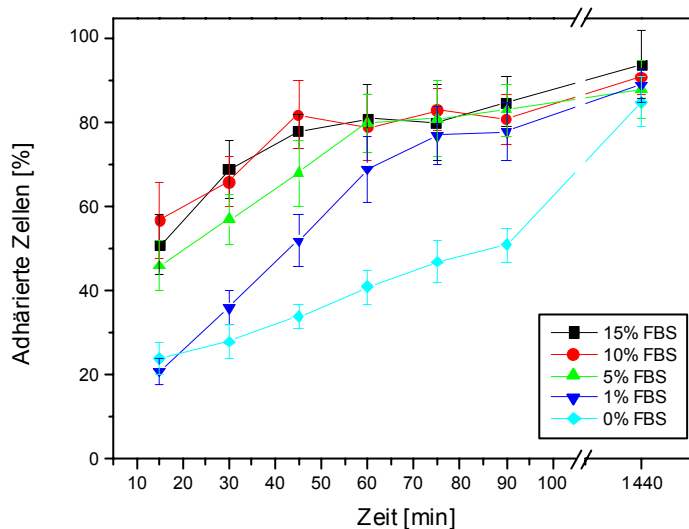
Im Vergleich mit den Effekten von Serum und Cytokinen ist der Einfluss des Basalmediums als gering anzusehen, solange die Medienwechsel ausreichend häufig durchgeführt wurden, um eine Limitierung von Medienkomponenten wie Aminosäuren oder Glucose zu verhindern. Dennoch ist zu erkennen, dass McCoy's 5a und ZKT-1 die besten Voraussetzungen für eine optimale Proliferation der primären osteogenen Zellen schaffen.

### 3.2.2 Serumeinfluss auf Adhäsion und Proliferation

Ein grundlegendes Ziel der Medienuntersuchungen lag in der Reduzierung des Serumgehaltes. Fötales Kälberserum stellt nicht nur eine undefinierte Komponente des Kulturmediums dar, sie erhöht auch das Risiko einer immunologischen Reaktion bei Implantationsversuchen im Tier. Darüber hinaus kann ein hoher Serumanteil durch verschiedenste Bestandteile die Inprozessanalytik beeinflussen. Beispielsweise enthält Serum auch nach Hitzeinaktivierung Proteine, die den Nachweis von Osteocalcin mittels ELISA im Medium beeinflussen. Auch die Negativkontrollen der Bestimmung von Alkalischer Phosphatase zeigten bei stark serumhaltigem Medium erhöhte Nullwerte. Da es sich bei beiden Faktoren



hauptsächlich um gebunden vorliegende Proteine handelt, ist ihre Konzentration in Kulturüberständen als sehr gering anzunehmen. Ein durch den Serumanteil erhöhtes Grundrauschen beeinflusst daher die Sensibilität dieser Messungen erheblich.



**Abbildung 3.12:** Primäre Zell-Adhäsion in Abhängigkeit von der FBS-Konzentration. Während bei FBS-Konzentrationen über 5% die Adhäsion sehr schnell abläuft, ist die Adhäsion in serumfreiem Medium in der frühen Adhäsionsphase deutlich reduziert. Nach 24 Stunden (1440 min.) hat sich dieser Unterschied annähernd ausgeglichen. Das Cytoskelett der Zellen im serumfreien Medium nimmt allerdings nicht die typische fibroblastoide Struktur an wie in den serumhaltigen Kulturen.

Serum fördert allerdings im Medium nicht nur die Proliferation, sondern durch die enthaltenen Adhäsionsfaktoren wie Vitronectin auch die Anheftung der Zellen auf der Plastikoberfläche der Kulturgefäße (Grzesik & Robey, 1994). Zur Untersuchung des Einflusses der FBS-Konzentration auf die primäre Adhäsion der Knochenvorläuferzellen (Abb. 3.12) wurden primäre osteogene Rattenzellen der vierten Passage in einer Dichte von  $2,5 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf T25-Flaschen ausplattiert und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Als Basalmedium wurde MEM alpha verwendet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden je zwei T25-Flaschen pro Serumkonzentration entnommen, das Medium einmal geschwenkt, abgesaugt und durch frisches serumhaltiges Medium ersetzt. Nach Ablauf von 90 Minuten wurden die Zellen aller Flaschen abtrypsiniert und gezählt. Die ermittelte Lebendzellzahl wurde als prozentualer Anteil adhärierter Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl ausplattierter Zellen dargestellt.

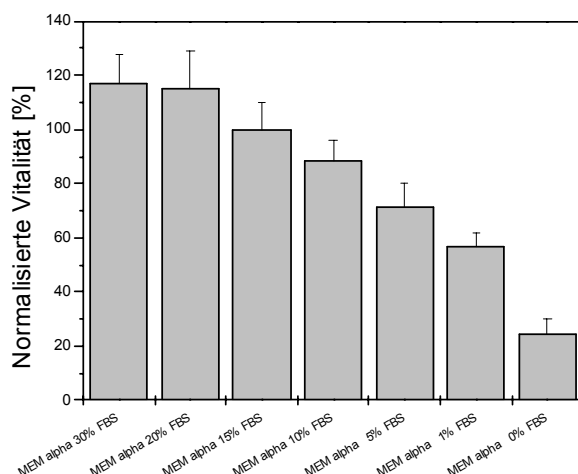
Dabei ergab sich, dass bis zu einem Serumgehalt von 5% keine signifikante Verschlechterung der primären Adhäsion zu verzeichnen war. Bei einem Serumgehalt von 1% war eine verlangsamte Adhäsion festzustellen. Im Gegensatz zu den serumreicheren Medien wurde hier erst nach 75 Minuten ein Plateau erreicht. Deutlich vermindert war die primäre Adhäsion in serumfreiem Kulturmedium. Nach 90 Minuten waren hier unter 50% der Zellen adhärert, während die serumhaltigen

Kulturmedien einen Anteil von etwa 80% der ausplattierten Zellen erreichten. Eine Endpunktbestimmung nach 24 Stunden ergab, dass in serumhaltigen Medien eine prozentuale Adhäsion von 88-94 % der Zellen erreicht wurde. Die Zellen waren zu diesem Zeitpunkt bereits in ihrer fibroblastoiden Form ausgespreitet. In serumfreiem Medium konnte nach 24 Stunden ebenfalls eine mittlere prozentuale Adhäsion von 85% festgestellt werden. Die Zellen waren allerdings nicht ausgespreitet, sondern hatten noch immer die abgerundete Struktur frisch angehefteter Zellen.

Das fötale Kälberserum hat demnach einerseits einen beschleunigenden Einfluss auf die primäre Adhäsion der osteogenen Zellen und andererseits eine essenzielle Bedeutung für das Ausspreiten der Zellen. Die nicht ausgespreiteten Zellen waren zwar noch über mehrere Tage vital, hatten aber keinerlei proliferative Aktivität mehr.

Zur Untersuchung des Serumeinflusses auf die Proliferation der Zellen (Abb. 3.13) wurden osteogene Rattenzellen der vierten Passage auf einer 48-Lochplatte in einer Dichte von 5000 Zellen/cm<sup>2</sup> in MEM alpha mit dem entsprechenden Serumanteil ausgesät. Nach Tag 3 wurde das Medium erneuert und an Tag 5 die Vitalität in sechsfach Bestimmung pro Serumkonzentration mit WST-1 ermittelt.

Dabei ergab sich eine deutliche mitogene Aktivität des verwendeten FBS auf die Zellen. Eine Erhöhung des Serumanteils auf über 20% führte allerdings nicht zu einer weiteren Steigerung der Proliferation. Die Reduzierung des Serums von 20 auf 1% verursacht einen annähernd linearen Abfall der Proliferation um etwa 60%. Die vollständige Entfernung des Serums verursachte gegenüber eines 1%igen Anteils erneut eine Reduzierung der Vitalität um ca. 30%. Der starke Abfall der Vitalität zwischen 1 und 0 % FBS lässt sich anhand der Adhäsionsdaten hauptsächlich auf das fehlende Ausspreiten des Cytoskeletts der Zellen bei serumfreier Kultur zurückführen.



**Abbildung 3.11:** Einfluss der Serumkonzentration auf die Proliferation, bestimmt mittels WST-1 Test nach fünftägiger Kultur. Der Wert für 15% FBS wurde auf 100% normalisiert.

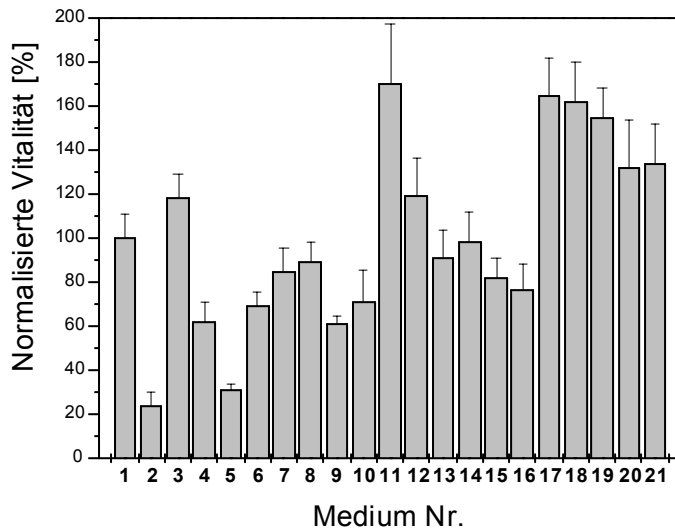
### 3.2.3 Einfluss von Cytokinen, Hormonen und Vitaminen

Auf der Suche nach einem geeigneten Medium für die Kultur von Knochenvorläuferzellen wurden 12 verschiedene Supplementfaktoren einzeln und in Kombination untersucht. Die lange Kulturdauer der Knochenzelldifferenzierung von ca. 35 Tagen verhindert eine Untersuchung aller Cytokinkombinationen in dieser Langzeitkultur. Daher wurde in einer Kurzzeitkultur (s. 3.2.3.1, Kulturdauer unter 10 Tagen) eine Vorauswahl anhand der beiden Parameter Proliferation und proteinspezifische Alkalische Phosphatase Aktivität getroffen. Nur Medien, die sich bei diesem Vorscreening als aussichtsreich zeigten, sollten anschließend in der Langzeitkultur (s. 3.2.3.2) mit umfangreicher Analytik getestet werden.

#### 3.2.3.1 Kurzzeitkultur

Um die mitogene Wirkung von FBS in Kulturmedium zu ersetzen, bieten sich eine Reihe von Cytokinen an, deren stimulierende Wirkung auf die Proliferation von Osteoblastenvorläufern bekannt ist (siehe 1.3.2.1): Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2) oder basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Platelet derived Growth Factor (PDGF), Epidermal Growth Factor (EGF) sowie Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) und Insulin. Die genannten Cytokine wurden zunächst auf ihre proliferative Wirkung als denkbarer Ersatz für eine serumreduzierte Kulturführung getestet. In einem Vorversuch wurden zunächst für alle Cytokine die geeigneten Konzentrationen bestimmt. Entsprechend den Herstellerangaben wurde dabei für alle Cytokine eine Verdünnungsreihe mit den folgenden Cytokinkonzentrationen gewählt: 1, 2, 5, 10, 15, 20 ng/ml. Nach einer Kulturdauer von 5 Tagen mit einem Mediumwechsel an Tag 3 wurden die Zellen in Triplikaten mit dem WST-1 Test untersucht. Dabei erwiesen sich 10 ng/ml bFGF, 10 ng/ml PDGF-BB, 5 ng/ml EGF und 15 ng/ml IGF-1 als optimal. Diese ermittelten Konzentrationen wurden sowohl beim Einzeleinsatz der Cytokine als auch in Kombination beibehalten. Zur Untersuchung der mitogenen Wirkung der Einzelkomponenten sowie deren Kombinationen wurde der WST-1-Test eingesetzt, der ein umfangreiches Screening vieler Proben bei vertretbarem Zeitaufwand ermöglichte. Dazu wurden die Zellen auf 48-Loch-Platten in einer Dichte von 5000 Zellen/cm<sup>2</sup> in dem entsprechend supplementierten Medium ausplattiert. Nach 3 Tagen wurde das Medium erneuert, nach 5 Tagen wurde die Vitalität bestimmt. Zur Kontrolle wurde auf jeder eingesetzten 48-Lochplatte eine Positiv- (15% FBS, MEM alpha) und eine Negativkontrolle (0% FBS, MEM alpha) mitgeführt.

Das Screening erfolgte mit Zellen der vierten Passage aus zwei verschiedenen Isolationen. Pro Isolation und Messpunkt wurden jeweils drei Vertiefungen auf der 48-Lochplatte vermessen.

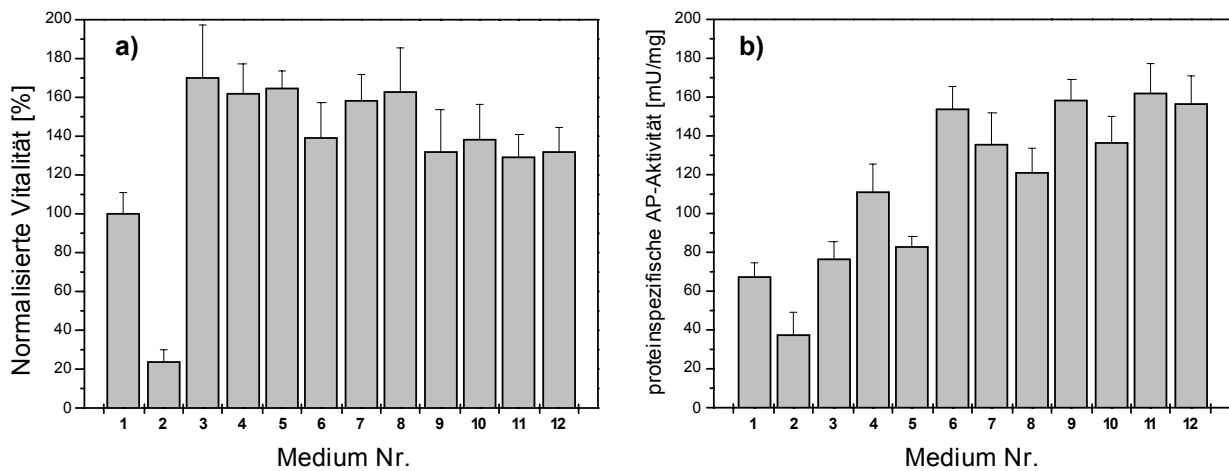


**Abbildung 3.12:** Einfluss der Cytokinkombinationen auf die Proliferation, Kurzzeituntersuchung mit WST-1. Cytokinkombination siehe Tabelle 3.1. Der Wert der Positivkontrolle (MEM alpha, 15% FBS) wurde auf 100% normalisiert.

**Tabelle 3.1:** Eingesetzte Cytokinkombinationen (s. Abb. 3.12); Positivkontrolle: MEM alpha 15% FBS, Negativkontrolle MEM alpha 0% FBS. DIF 1000= ZKT-I mit Insulin (10 mg/ml), Transferrin (5 mg/ml) und Albumin (Albumax, Life Technologies, 1:10).

	Medium		Medium
<b>1</b>	MEM alpha 15% FBS	<b>11</b>	DIF 1000, 1% FBS, PDGF-BB, bFGF
<b>2</b>	MEM alpha 0% FBS	<b>12</b>	DIF 1000, 1% FBS, PDGF-BB, EGF
<b>3</b>	ZKT-I 15% FBS	<b>13</b>	DIF 1000, 1% FBS, PDGF-BB, IGF-1
<b>4</b>	ZKT-I 1% FBS	<b>14</b>	DIF 1000, 1% FBS, bFGF, EGF
<b>5</b>	ZKT-I 0% FBS	<b>15</b>	DIF 1000, 1% FBS, bFGF, IGF-1
<b>6</b>	DIF 1000, 1% FBS	<b>16</b>	DIF 1000, 1% FBS, EGF, IGF-1
<b>7</b>	DIF 1000, 1% FBS, bFGF	<b>17</b>	DIF 1000, 1% FBS, PDGF-BB, bFGF, EGF
<b>8</b>	DIF 1000, 1% FBS, PDGF-BB	<b>18</b>	DIF 1000, 1% FBS, PDGF-BB, bFGF, IGF-1
<b>9</b>	DIF 1000, 1% FBS, IGF-1	<b>19</b>	DIF 1000, 1% FBS, PDGF-BB, bFGF, EGF, IGF-1
<b>10</b>	DIF 1000, 1% FBS, EGF	<b>20</b>	ZKT-1, 1% FBS, PDGF-BB, bFGF
		<b>21</b>	MEM alpha, 1% FBS, PDGF-BB, bFGF

Nach dem beschriebenen Prinzip wurde zunächst die für die Proliferation vielversprechendste Cytokinkombination ermittelt (Abb. 3.12; Tabelle 3.1). Danach wurde auf Basis des mitogen wirksamsten Mediums (Medium Nr. 11) der Einfluss osteogener Supplementen auf Proliferation und Differenzierung untersucht (Abb. 3.13; Tabelle 3.2). Zusätzlich wurde dabei die proteinspezifische AP-Aktivität an Tag 5 nach Konfluenz als Differenzierungsmarker bestimmt.



**Abbildung 3.13:** Einfluss der osteogenen Supplemente L-Ascorbat-2-Phosphat,  $\beta$ -Glycerophosphat, Dexamethason und  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{VitaminD}_3$  auf Proliferation (a) und AP-Synthese (b). Eingesetzte Supplementkombinationen siehe Tabelle 3.2. Der Wert der Positivkontrolle (Medium 1) wurde auf 100% normalisiert.

**Tabelle 3.2:** Eingesetzte osteogene Supplemente: L-Asc-2-P = L-Ascorbat-2-Phosphat,  $\beta$ -GP =  $\beta$ -Glycerophosphat, Dex = Dexamethason, VitD3 =  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{VitaminD}_3$ .

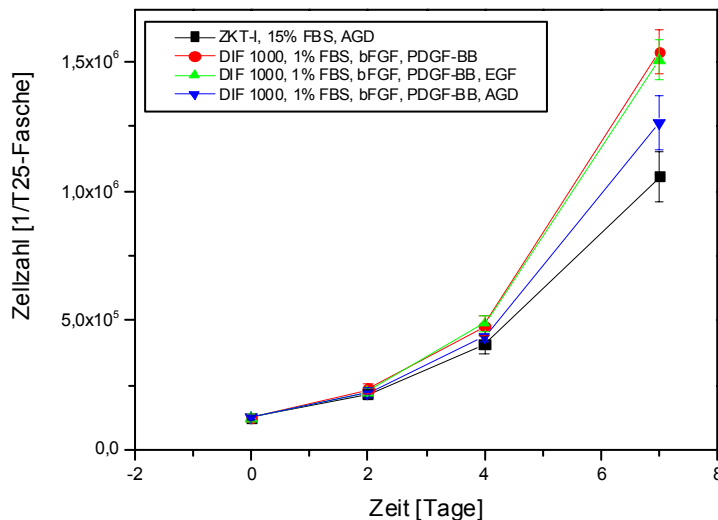
Probe Nr.	Medium
1	MEM alpha 15% FBS
2	MEM alpha 0% FBS
3	DIF 1000, 1% FBS, PDGF-BB, bFGF
4	DIF 1000, 1% FBS, PDGF-BB, bFGF, L-Asc-2-P
5	DIF 1000, 1% FBS, PDGF-BB, bFGF, $\beta$ -GP
6	DIF 1000, 1% FBS, PDGF-BB, bFGF, Dex.
7	DIF 1000, 1% FBS, PDGF-BB, bFGF, VitD3
8	DIF 1000, 1% FBS, PDGF-BB, bFGF, L-Asc-2-P, $\beta$ -GP
9	DIF 1000, 1% FBS, PDGF-BB, bFGF, L-Asc-2-P, $\beta$ -GP, Dex
10	DIF 1000, 1% FBS, PDGF-BB, bFGF, L-Asc-2-P, $\beta$ -GP, VitD3
11	DIF 1000, 1% FBS, PDGF-BB, bFGF, L-Asc-2-P, $\beta$ -GP, Dex, VitD3
12	DIF 1000, 1% FBS, PDGF-BB, bFGF, L-Asc-2-P, $\beta$ -GP, Dex, IGF-1

Das Basalmedium ZKT-I supplementiert mit Insulin, Transferrin und Albumin und als DIF 1000 bezeichnet ist für die serumfreie Kultur einer Vielzahl tierischer Zelllinien geeignet (Jäger et al., 1988). Der positive Einfluss dieser drei Supplemente zeigt sich vor allem im Vergleich mit den Basalmedien ZKT-I und MEM alpha in Kombination mit den Cytokinen bFGF und PDGF-BB (Medium Nr. 11 gegenüber Medien 20 und 21; Abb. 3.12).

Bei der Kombination der verschiedenen Cytokine ergab sich, dass die mitogene Wirksamkeit in der Reihe IGF-1 < EGF < bFGF < PDGF-BB ansteigt (Abb. 3.12, Medien Nr. 7-10). Dabei sind bFGF und PDGF-BB als mitogen wirksam einzustufen, während die proliferative Wirksamkeit von EGF und IGF-1 als Einzelkomponenten minimal ist. Insbesondere in der Kombination beider Faktoren zeigen bFGF und PDGF-BB starke mitogene Wirksamkeit, die auf einen Synergismus der Wirkung beider Cytokine hindeutet. Die deutliche Erhöhung der Vitalität relativ zur Positivkontrolle mit 15% FBS konnte durch keine andere Cytokinkombination erreicht werden, obwohl die Kombinationen von EGF mit PDGF-BB (Medium Nr. 12) und EGF mit bFGF (Medium Nr. 14) ebenfalls eine deutlich Steigerung der Zellausbeute erbrachten. Die Kombination aus den drei Faktoren bFGF, PDGF-BB und EGF zeigte jedoch keine weitere Steigerung der Vitalität relativ zu der Kombination aus bFGF und PDGF-BB allein. IGF-1 erwies sich in den Experimenten als mitogen nicht wirksam. Dies kann auf die hohe Insulinkonzentration zurückgeführt werden, da Insulin strukturhomolog mit IGF-1 ist und ebenfalls an die IGF-Rezeptoren bindet. Die Bindungsaffinität von Insulin ist allerdings deutlich kleiner als die von IGF-1. Durch den starken Konzentrationsüberschuss im Medium wird diese Differenz allerdings überkompensiert.

Die Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses osteogener Supplemente auf Differenzierung und Proliferation der Zellen der vierten Passage zeigten, dass hier vor allem das Glucocorticoidhormon Dexamethason einen Einfluss ausübt (Abb. 3.13). Dabei zeigte sich, dass in den dexamethasonhaltigen Kulturen sowohl die Proliferation leicht vermindert als auch die AP-Bildung signifikant erhöht war. Es zeigte sich aber auch, dass die Differenzierung der Zellen auch ohne Dexamethason ablief. Dies deutet darauf hin, dass auch noch in der vierten Passage eine Mischung aus induzierbaren und determinierten Knochenvorläuferzellen vorlag (Puzas, 1996). Während die induzierbaren Knochenvorläuferzellen durch den Einfluss von Dexamethason zur Differenzierung angeregt werden, sind die determinierten Knochenvorläuferzellen in ihrer Differenzierung schon so weit fortgeschritten, dass sie auch ohne weitere exogene Faktoren die osteogene Differenzierung durchlaufen. Auch das für die Bildung der Kollagenmatrix essenzielle L-Ascorbat-2-Phosphat übte einen stimulierenden Einfluss auf die Differenzierung der Zellen aus. Eine direkte Einflussnahme von L-Ascorbat auf die AP-Synthese ist bisher nicht nachgewiesen. Wahrscheinlicher ist daher, dass durch die Ausbildung einer Kollagenmatrix über das

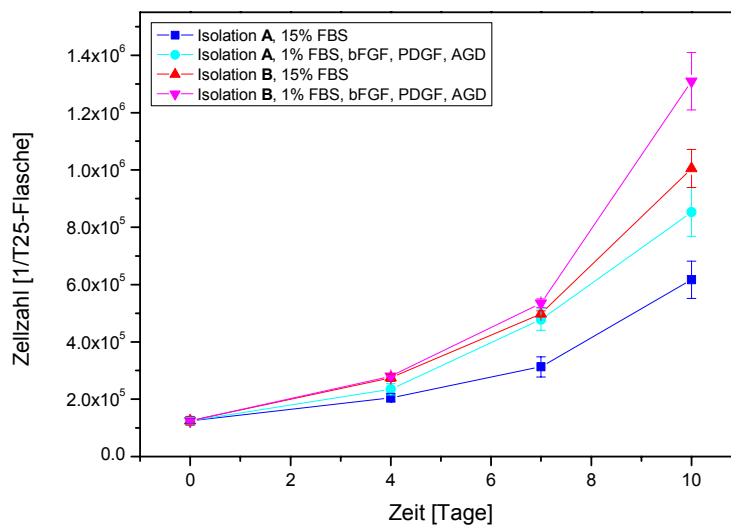
Kollagen selbst ein Einfluss in Richtung der osteogenen Differenzierung ausgeübt wird (Haralson & Hassel, 1995).  $1\alpha$ , 25-Dihydroxy-Vitamin  $D_3$  übt ähnlich wie Dexamethason eine stimulierende Wirkung auf die Differenzierung der Zellen aus. Die Kombination beider Supplemente zeigt allerdings keine synergistische Wirkung, vielmehr war keine Erhöhung der AP-Aktivität gegenüber dem alleinigen Einsatz von Dexamethason festzustellen.



**Abbildung 3.14:** Zellzahlentwicklung mit den aussichtsreichsten Cytokinkombinationen. AGD: L-Ascorbat-2-Phosphat,  $\beta$ -Glycerophosphat, Dexamethason.

Zur Überprüfung der mit dem WST-1 Screening erhaltenen Daten wurde mit den aussichtsreichsten Cytokinkombinationen eine weitere Proliferationskinetik angesetzt, in deren Verlauf die Lebendzellzahlen mittels Trypanblaufärbung ermittelt wurden. Obwohl WST-1 in Vorversuchen eine gute Verlässlichkeit hinsichtlich der Vergleichbarkeit der relativen Vitalitätswerte und der absoluten Zellzahlen gezeigt hat, sollte mit diesem Experiment die durch das WST-1-Screening erhaltene Medien auf ihre Wirksamkeit überprüft werden. Dazu wurden je Medium 9 T25-Flaschen mit einer Dichte von 5000 Zellen/cm<sup>2</sup> besiedelt und je drei Flaschen an den Tagen 2, 4 und 7 abtrypsiniert und gezählt. Das Ergebnis (Abbildung 3.14) bestätigt die durch die WST-1 Tests erhaltenen Daten. FBS kann in der proliferativen Phase durch eine Cytokinkombination aus bFGF und PDGF-BB weitgehend ersetzt werden. Ein kompletter Verzicht auf Serum war aufgrund seiner Wirkung auf Adhäsion und Ausspreiten der Zellen nicht möglich. Der Zusatz von EGF zu den Cytokinen bFGF und PDGF führte nicht zu einer weiteren Stimulierung der Proliferation. Die Zugabe

der osteogenen Supplemente L-Ascorbat-2-Phosphat,  $\beta$ -Glycerophosphat und Dexamethason führte zu einer leichten Verminderung der Proliferation, die allerdings mit einer deutlichen Stimulation der Differenzierung osteogener Zellen einhergeht und daher in Kauf genommen wurde. Das für die Proliferation und Differenzierung am geeignetsten erscheinende Medium ist demnach ZKT-I supplementiert mit Pen/Strep, 1% FBS, 1% Albumin, 10 mg/ml Insulin, 5 mg/ml Transferrin, 10 ng/ml bFGF, 10 ng/ml PDGF-BB, L-Ascorbat-2-Phosphat (0,2 mM),  $\beta$ -Glycerophosphat (10 mM) und Dexamethason (10 nM).

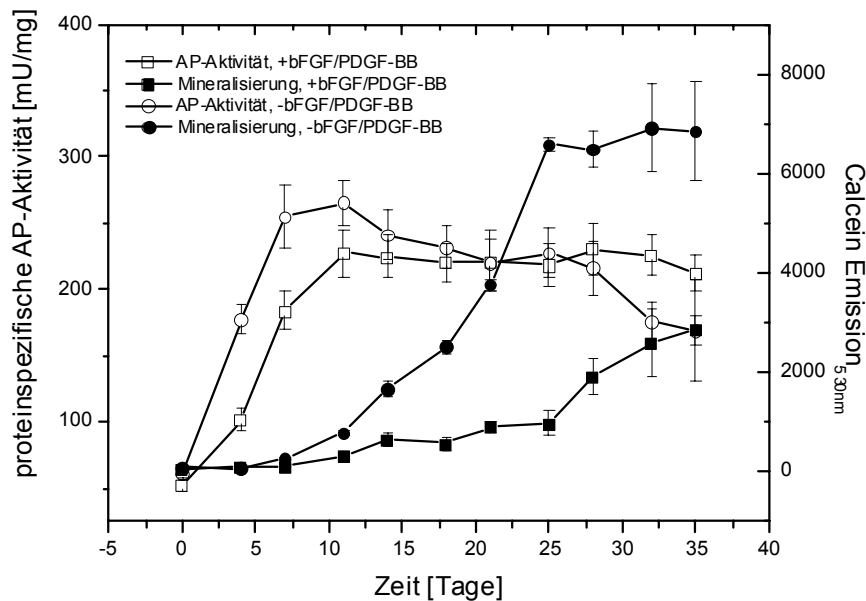


**Abbildung 3.15:** Vergleich der Wirksamkeit von serumhaltigem Medium und serumreduziertem Medium mit Cytokinen auf die Proliferation von humanen osteogenen Zellen aus zwei unterschiedlichen Isolationen **A** und **B**. AGD: L-Ascorbat-2-Phosphat,  $\beta$ -Glycerophosphat, Dexamethason.

Zur Überprüfung der Wirksamkeit des für die Kultur primärer osteogener Rattenzellen optimierten Mediums auf die Proliferation von primären humanen Knochenvorläuferzellen wurde das als am geeignetsten erscheinende Medium für die Kultivierung zweier Humanzellkulturen eingesetzt. Die Zellen des Isolates A wurden aus Spongiosa eines Femurs isoliert. Die Zellen des Isolates B stammten aus einer heterotopen Ossifikation (s. 2.1.2.3). Letztere proliferieren deutlich schneller als die Zellen des Isolates A. Die Lebendzellzahlbestimmungen an den Tagen 4, 7 und 10 ergaben, dass die Proliferation bei beiden Isolaten durch den Einsatz des cytokinhaltigen serumreduzierten Mediums verbessert werden konnte. An Tag 10 war die Zellausbeute bei beiden Isolaten um etwa 30% erhöht.



## 3.2.3.2 Langzeitkultur



**Abbildung 3.15:** Vergleich der Langzeitkulturen osteogener Zellen der 4. Passage mit oder ohne Zusatz von bFGF und PDGF-BB in der Differenzierungsphase: AP-Entwicklung und Calcein-Fluoreszenz als Indikator für die Mineralisierung.

Zur Überprüfung der Verwendbarkeit des im Rahmen des Screenings (3.2.3.1) als optimal ermittelten Mediums in der Langzeitkultur wurde eine 35tägige Differenzierungskinetik durchgeführt, in deren Verlauf die proteinspezifische Alkalische Phosphatase Aktivität und die Mineralisierung der extrazellulären Matrix als Differenzierungsparameter bestimmt wurden (Abb.3.15). Dabei ergab sich im Vergleich zu den mit 15% FBS durchgeführten Experimenten (Abb. 3.7) eine signifikante Erniedrigung der Mineralisierung. Die Gründe hierfür liegen in dem inhibitorischen Einfluss der mitogenen Cytokine bFGF und PDGF-BB auf die osteogene Matrixsynthese (s. 1.3.2.1, Hurley et al., 1993, Hock & Canalis, 1994). Die Differenzierungskinetik wurde daher wiederholt, wobei die mitogenen Cytokine bFGF und PDGF-BB allerdings nach Erreichen der Konfluenz (Tag 0) durch einen Medienwechsel entfernt wurden (serum- und cytokinreduzierter Ansatz). Die neue Kultivierungsstrategie führte zu einer deutlich beschleunigten Differenzierung sowohl gegenüber dem cytokinhaltigem Ansatz (Abb. 3.15) als auch im Vergleich zur ursprünglichen Kinetik (Abb. 3.7), wie durch die Bestimmung der proteinspezifischen Alkalischen Phosphatase und die Mineralisierung der ECM gezeigt werden konnte. Das Maximum der proteinspezifischen Alkalischen Phosphatase wurde bereits nach 7 Tagen erreicht, während dieses in der Kinetik mit 15% FBS erst nach 14 Tagen

erreicht wurde. Genauso war eine signifikant frühere Mineralisierung zu beobachten. Das Plateau der Mineralisierung wurde bei dem cytokinreduzierten Ansatz nach 25 Tagen und somit ca. 7 Tage früher als bei dem FBS-haltigen Ansatz erreicht.

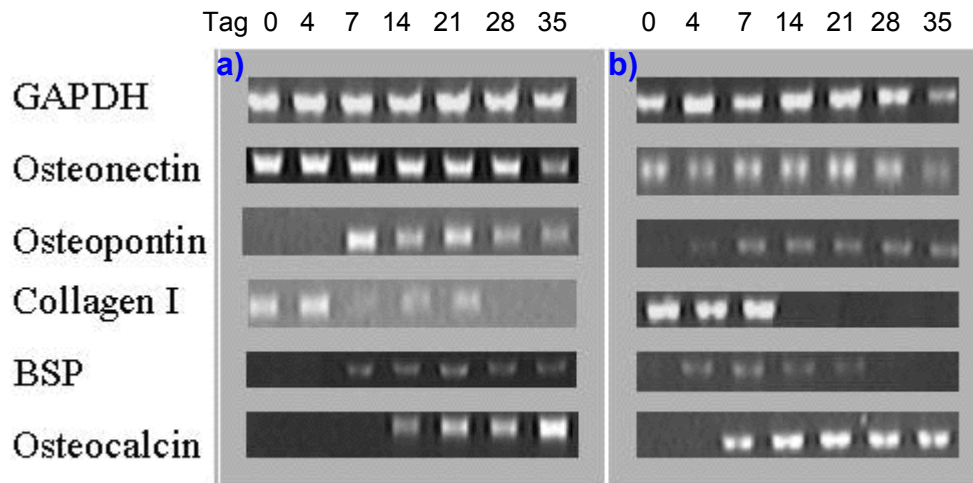


Abbildung 3.16: RT-PCR Vergleich zwischen Standardmedium (a, entspricht Abb. 3.9), und serumreduziertem Medium ohne mitogene Cytokine in der Differenzierungsphase (b).

Beim Vergleich des serum- und cytokinreduzierten Ansatzes mit der FBS-haltigen Kultur mittels RT-PCR (Abb. 3.16, 3.9) bestätigte sich die Beschleunigung der Differenzierung. Während die Expression von Kollagen I im cytokinreduzierten Ansatz deutlich früher beendet ist, zeigt sich ebenfalls ein früheres Auftreten der späten Marker der Osteogenese *Bone Sialo Protein* (BSP) und Osteocalcin (OC). Das hauptsächlich auf Präosteoblasten zu findende BSP kann an Tag 28 und 35 der cytokinreduzierten Kultur nicht mehr nachgewiesen werden. Dies deutet daraufhin, dass durch die gewählte Kulturführung eine sehr viel einheitlichere Verschiebung hin zu den späten Differenzierungsstadien erzeugt wurde. Das RT-PCR-Muster nach Tag 21 zeigt, dass ausschließlich reife Osteoblasten oder Osteozyten in der Kultur vorliegen. Es ist also davon auszugehen, dass die gewählten Kulturbedingungen eine weitaus schnellere Differenzierung auch der frühen Vorläuferzellen erzeugen.

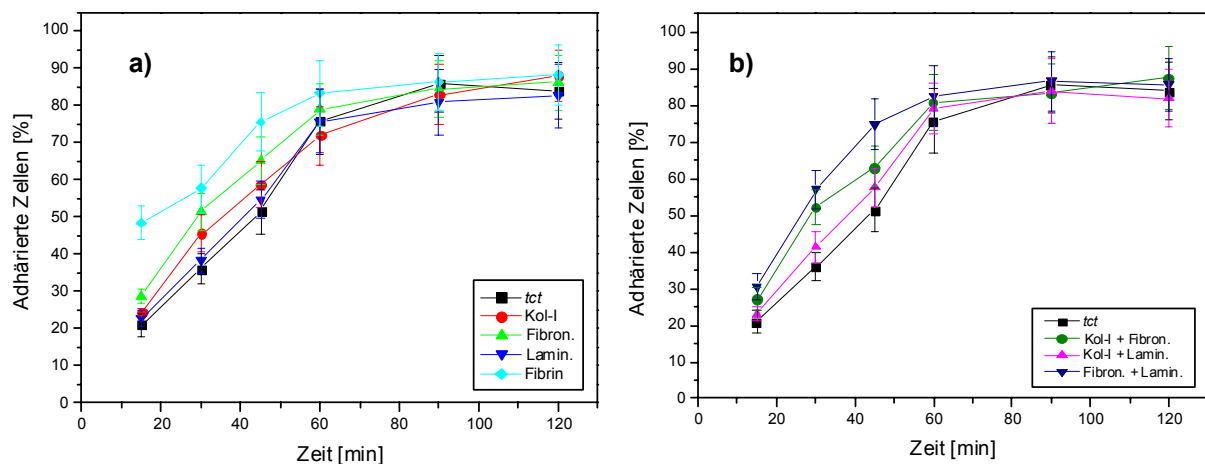
### **3.3 Kulturführung auf Trägergerüsten in statischer Kultur**

#### **3.3.1 Besiedlungsmethode und Besiedlungsdichte**

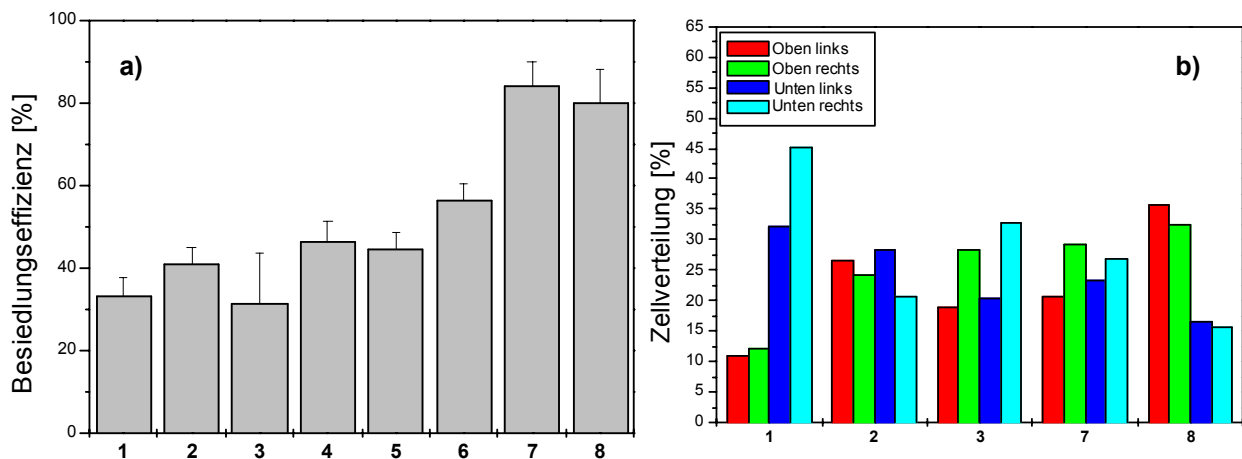
Die verwendeten Trägergerüste mit einem Gesamtvolumen zwischen 0,75 und 1,1 cm<sup>3</sup> müssen möglichst homogen besiedelt werden. Außerdem gilt es, die Zellen möglichst quantitativ im Trägergerüst zu adhären, da die Vermehrungsfähigkeit speziell humaner Zellen patientenabhängig stark limitiert sein kann und Verluste während der Besiedlungsphase somit eventuell während der sich anschließenden *in vitro* Kultivierungsphase nicht durch Proliferation der restlichen Zellen ausgeglichen werden können.

Zunächst wurden daher verschiedene Möglichkeiten der Oberflächenbeschichtung im 2D-Modell auf Kulturflaschen untersucht, um die Einflüsse einer Oberflächenmodifikation des Gerüstmaterials zur Verbesserung der Besiedlung abzuschätzen (Abb. 3.17). Die effektivsten Beschichtungsmethoden wurden dann zusammen mit unterschiedlichen Besiedlungsmethoden im 3D-Modell untersucht (Abb. 3.18). Nach der Ermittlung einer geeigneten Besiedlungsdichte (Abb. 3.19) wurden dann die zur Verfügung stehenden Trägergerüste auf ihre Eignung zur Besiedlung und Vermehrung getestet (Abb. 3.20).

Wie Abb. 3.17 zeigt, war in Zellkulturmedium mit 1% FBS durch gängige Oberflächenbeschichtungen eine leichte Beschleunigung der primären Adhäsion von osteogenen Rattenzellen möglich. Als Kontrolle diente die unbeschichtete aber für Zellkultur vorbehandelte (*tissue culture treated* = *tct*) Oberfläche von Zellkulturflaschen. Während Kollagen-I- und Lamininbeschichtung keine signifikante Verbesserungen ergaben, war mit Fibrin und Fibronectin eine erkennbare Beschleunigung der Adhäsion zu erkennen. Eine weitere leichte Verbesserung der Adhäsion war durch die Kombination von Fibronectin und Laminin zu beobachten.



**Abbildung 3.17:** Einfluss von Kollagen I, Fibronectin, Laminin, Fibrin (a) und deren Kombinationen (b) auf die Adhäsion von osteogenen Primärzellen der Ratte. tct = tissue culture treated (für die Zellkultur geeignete Plastikoberflächen).



- 1: Einfachbesiedlung
- 2: Doppelbesiedlung
- 3: Besiedlungsmethode nach Kim et al.
- 4: Doppelbesiedlung nach Kollagen-I/Fibronectin –Beschichtung
- 5: Doppelbesiedlung nach Laminin/ Fibronectin-Beschichtung
- 6: Doppelbesiedlung mit Medium erhöhter Viskosität
- 7: Doppelbesiedlung in Trägerhalterung
- 8: Einzelbesiedlung mit Fibrin

**Abbildung 3.18:** Vergleich unterschiedlicher Besiedlungsmethoden im Camceram-Trägergerüst. Bestimmung der Besiedlungseffizienz (a) und der Zellverteilung im Trägermaterial (b) anhand einer Zellzahlbestimmung mit Hoechst 33258. Besiedlungseffizienz =  $\left[ \frac{\text{Zellzahl im Trägergerüst}}{\text{Zellzahl im Trägergerüst} + \text{Zellzahl im Kulturüberstand}} \right] \cdot 100\%$ .

Anhand des Besiedlungsverfahrens selbst konnte allerdings eine weitaus größere Einflussnahme auf die Besiedlungseffizienz ausgeübt werden, als dies mittels Oberflächenbeschichtung möglich war (Abb. 3.18a). Zur Vorbereitung auf die

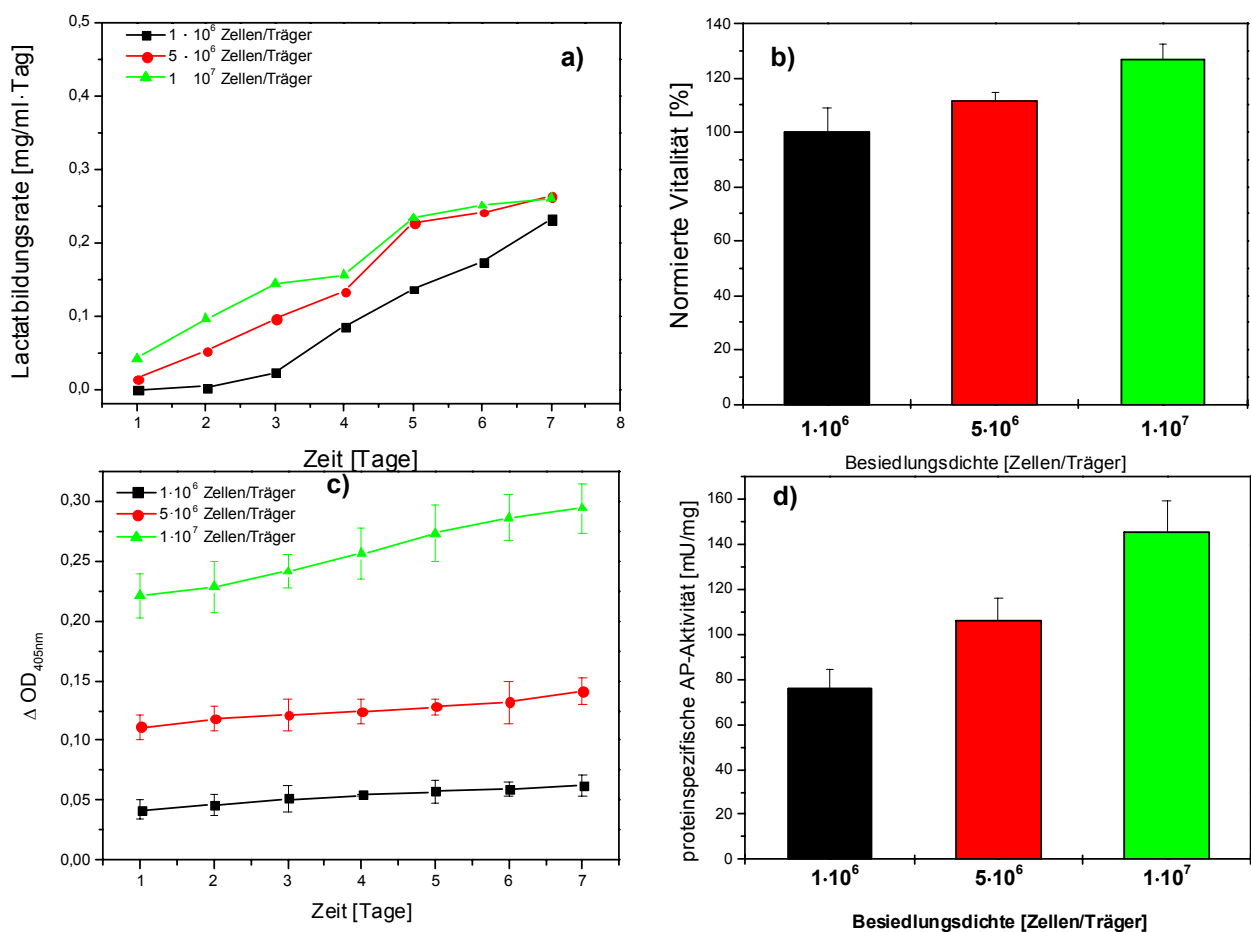
Besiedlung wurden die Trägergerüste nach der Sterilisation 24 Stunden in Kulturmedium inkubiert. Direkt vor der Besiedlung wurde das Medium abgesaugt und die Zellsuspension mit  $1,25 \cdot 10^7$  Zellen/ml in einem Gesamtvolumen von 400  $\mu$ l aufgetragen, so dass die Gesamtzellzahl pro Trägergerüst  $5 \cdot 10^6$  Zellen betrug. Die Auftragung erfolgte tropfenweise auf eine Seitenfläche bei der Einzelbesiedlung (Abb. 3.18, Nr. 1, 8) oder in zwei Schritten zu je 200  $\mu$ l auf gegenüberliegende Seitenflächen bei einer Doppelbesiedlung (Abb. 3.18, Nr. 2, 4-7). Zur Adhäsion wurden die Träger zunächst für 90 Minuten in 12-Lochplatten im Brutschrank inkubiert und anschließend in 15ml-Röhrchen (Falcon) mit 10 ml Zellkulturmedium überführt und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Bei der Besiedlungsmethode des „*agitated seeding*“ (Kim et al., 1997) wurden die Trägergerüste zusammen mit 5 ml Zellsuspension der Konzentration  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml in ein 15ml-Röhrchen überführt und über Nacht auf einem Thermomixer bei 37°C und 100 UPM geschüttelt (Abb. 3.18, Nr. 3). Zur Bestimmung des Effektes einer erhöhten Viskosität wurde das zur Besiedlung verwendete Kulturmedium auch mit 2% Methylcellulose angesetzt (Abb. 3.18, Nr. 6). Die Einzelbesiedlung mit Fibrin (Abb. 3.18, Nr. 8) erfolgte nach Beschichtung des Trägergerüsts mit Thrombin mit einer Zellsuspension in fibrinogenhaltigem Zellkulturmedium (s. 2.1.4). Außerdem wurde eine Doppelbesiedlung in der Festbetthalterung des Bioreaktors vorgenommen. Der Vorteil dieser Methode lag darin, dass das zu besiedelnde Trägergerüst aufgrund der Fixierung in der Halterung keinerlei Kontakt zu der Kulturoberfläche der 12-Lochplatte hatte. Den Zellen wurde so keine alternativ geeignete Kulturfläche neben der Gerüstoberfläche zur Verfügung gestellt. Die Zellsuspension wurde auf diese Weise durch den Kapillareffekt ins Innere des Trägergerüsts gesaugt und konnte diesen nicht wieder verlassen. Damit ist die einzige zur Verfügung stehende Oberfläche für die Adhärenz der Zellen die Fläche des Trägergerüsts.

Die Zellzahlbestimmung auf den Trägern erfolgte durch den fluoreszenzphotometrischen Nachweis von DNA mit Hoechst 33258 nach Homogenisation und Lyse der Zellen. Zur Bestimmung des Verbleibs der Zellen im Träger (Abb. 3.18b) wurden die kubischen Camceramträger ( $1 \text{ cm}^3$ ) mit einem Skalpell in gleich große Viertel geteilt. Die gegenüberliegenden Flächen, auf die die Zellsuspension aufgetragen wurde, wurden als „oben“ und „unten“ bezeichnet. Bei Einzelbesiedlungen wurde die zur Beladung verwendete Fläche als „oben“ bezeichnet. Bei der Besiedlung nach Kim et al. wurde die Bezeichnung der Viertel

willkürlich vorgenommen, da keine definierte Seitenfläche zur gerichteten Besiedlung vorlag. Die im Zellkulturmedium der 12-Lochplatte und des 15ml-Röhrchens verbliebenen Zellen wurden nach Kristallviolettfröbung in einer Zählkammer gezählt. Als Hauptproblem der Besiedlung stellte sich der durch die Poren des Trägergerüsts hervorgerufene Kapillareffekt heraus, der dazu führte, dass die Zellsuspension das Trägergerüst schnell durchströmte und die Zellen bei Kontakt mit der darunterliegenden Kulturoberfläche der 12-Lochplatte dieses auch wieder zu einem hohen Prozentsatz verließen. Dieser Effekt konnte weder durch eine Erhöhung der Medienviskosität noch durch eine Beschichtung des Trägers ausreichend vermindert werden. Gut erkennbar ist dies an der Zellverteilung der Einzelbesiedlung (Abb. 3.18b, 1). Die Zellkonzentration in der unteren Hälfte ist mehr als dreimal so hoch wie die Zellkonzentration in der oberen Hälfte des Trägergerüsts. Eine Doppelbesiedlung auf gegenüberliegenden Flächen des Gerüsts gleicht dieses Missverhältnis weitgehend aus (2). Die Besiedlungsmethode nach Kim et al. (3), die eben diesen Kapillareffekt des porösen Trägers ausnutzt, zeigt ebenfalls eine verhältnismäßig gute Zellverteilung, liefert allerdings durch das notwendige Suspensionsvolumen nur eine Besiedlungseffizienz von deutlich unter 40%. Eine sehr gute Besiedlungseffizienz wird bei der Besiedlung erreicht, wenn den Zellen in der primären Adhäsionsphase durch Abheben des Gerüsts von anderen besiedelbaren Oberflächen keine Alternative zur Anheftung an der Gerüstoberfläche geboten wird. Dies kann sehr effektiv durch die Verwendung des Festbetthalterings erreicht werden (7). Die Besiedlung mit dem Zweikomponentensystem aus Fibrinogen und Thrombin, das zu einer schnellen Ausbildung einer Fibrinmatrix im Trägergerüst führt, zeigt ebenfalls eine sehr hohe Effizienz der Besiedlung, führt aber zu einer ungleichmäßigen Verteilung der Zellen im Trägergerüst (8). Bedingt durch schnelle Ausbildung der Fibrinmatrix wird die Majorität der Zellen bereits im oberen Bereich des Trägergerüsts immobilisiert. Das gebildete Fibrin verursacht darüber hinaus das praktische Problem einer Blockierung der Proben, die die Perfusion des Trägergerüsts mit Kulturmedium im Festbettbioreaktor verhindern würde.

Der Einsatz der Besiedlungsmethode im Haltering erbrachte eine durchschnittliche Adhäsion von deutlich über 80% bei allen verwendeten Trägergerüsten (Osteofoam, Camceram, Vitoss). Dies stellt auch im Vergleich mit anderen statischen Besiedlungsmethoden eine Verbesserung der bisher erreichten Besiedlungseffizienz dar, die zwischen ~45% (Shea et al., 2000) und ~70% (Ishaugh-Riley et al., 1998)

lag. Eine vergleichbar effektive Adhäsion konnte mit ca. 85% bisher nur unter Verwendung von Fibrin bei einer dynamischen Besiedlungsmethode vergleichbar der nach Kim et al. erreicht werden (Kon et al., 2000; Cancedda, 2001). Da vielfach mit primären tierischen Zellen oder Zelllinien gearbeitet wird, die in quasi unbegrenzter Zahl vorliegen, wird der Besiedlungseffizienz häufig keine besondere Bedeutung beigemessen. Für den autologen humanen Einsatz ist ein effektiver Einsatz der gewonnenen Zellen allerdings von erheblicher Bedeutung. Eine Verbesserung des Besiedlungsverfahrens wirkt sich hier insbesondere aufgrund des z.T. geringen Expansionspotenzials auf die Kulturdauer *ex vivo* aus (Bruder et al., 1997).



**Abbildung 3.19:** Vergleich der Zellproliferation bei unterschiedlichen Besiedlungsdichten auf Camceram-Gerüstträgern in statischer Kultur. a) Lactatbildungsrate, b) normalisierte Vitalitätsbestimmung mit WST-1 an Tag 7 c) Bestimmung der löslichen AP, d) Bestimmung der proteinspezifischen AP an Tag 7.

Ein weiterer für die Kultivierung auf Trägergerüsten entscheidender Parameter ist die Besiedlungsdichte (Abbildung 3.19). Die Ansiedlung einer zu geringen Zellzahl pro Träger kann in einer Vereinzelung der Zellen auf zu großer Fläche und damit quasi klonalen Wachstumsbedingungen resultieren. Die Folge wäre ein Verlust oder eine

starke Minderung der proliferativen Aktivität der Zellen. Andererseits sollen die Zellen nicht überkonfluent ausgesät werden, um ein weiteres Wachstum auf den Trägergerüsten zu ermöglichen und den Zellverlust bei der Besiedlung minimal zu halten. Es wurden drei verschiedene Besiedlungsdichten getestet:  $1 \cdot 10^6$ ,  $5 \cdot 10^6$  und  $1 \cdot 10^7$  Zellen/Träger. Kubische Camceramgerüste von  $1 \text{ cm}^3$  Größe wurden nach dem beschriebenen Verfahren der Doppelbesiedlung im Haltering besiedelt und in 30 ml Medium in 50ml-Röhrchen in statischer Kultur für 7 Tage im Brutschrank kultiviert. Nach 4 Tagen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

Die Lactatbildungsrate als metabolischer Parameter (Abb. 3.19a) zeigt, dass die Zellen in allen drei Ansätzen proliferieren. Bei der niedrigsten Besiedlungsdichte von  $1 \cdot 10^6$  Zellen pro Träger ist während der ersten drei Tage keine Erhöhung der Lactatbildungsrate festzustellen. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen in diesem Ansatz deutlich länger benötigen, um nach der Ansiedlung wieder in die exponentielle Wachstumsphase einzutreten. Danach erfolgt allerdings eine starke Proliferation der Zellen, so dass die nach 7 Tagen bestimmte relative Vitalität (Abb. 3.19b) dieser Träger lediglich 20% unterhalb der mit der zehnfachen Zellmenge besiedelten Träger liegt. Die Bestimmung der löslichen Alkalischen Phosphatase im Medium (Abb. 3.19c) und insbesondere die Bestimmung der proteinspezifischen Alkalischen Phosphatase nach Kulturende (Abb. 3.19d) zeigen, dass die Zellen der dichter besiedelten Träger im Differenzierungsprozess deutlich weiter fortgeschritten sind. Die lösliche AP ist nicht zellspezifisch berechnet, die großen Unterschiede sind daher auch durch die höheren Ausgangszelldichten zu erklären. Der stärkste Anstieg der löslichen AP ist im Verlauf der siebentägigen Kultur nur bei der höchsten Besiedlungsdichte von  $1 \cdot 10^7$  Zellen/Träger zu beobachten. Die proteinspezifische AP-Aktivität in diesen Trägergerüsten ist fast 1,5 mal höher als die der Träger mit einer Besiedlungsdichte von  $5 \cdot 10^6$  Zellen pro Träger und annähernd doppelt so hoch wie die der Träger mit der niedrigsten Besiedlungsdichte von  $1 \cdot 10^6$  Zellen pro Träger. Die erhaltenen Messdaten zeigen, dass bei allen drei Besiedlungsdichten innerhalb der ersten 7 Tage ein deutliches Zellwachstum zu verzeichnen ist. Dabei ist die Proliferation bei den beiden Besiedlungsdichten  $1 \cdot 10^6$  und  $5 \cdot 10^6$  Zellen pro Träger deutlich stärker als bei der hohen Animpfdichte von  $1 \cdot 10^7$  Zellen pro Träger. Dagegen ist bei der hohen Besiedlungsdichte bereits innerhalb der ersten 7 Tage ein Fortschreiten der Differenzierung zu erkennen. Vergleicht man die an Tag 7 gemessene proteinspezifische AP-Aktivität mit den in Zellkulturflaschen ermittelten

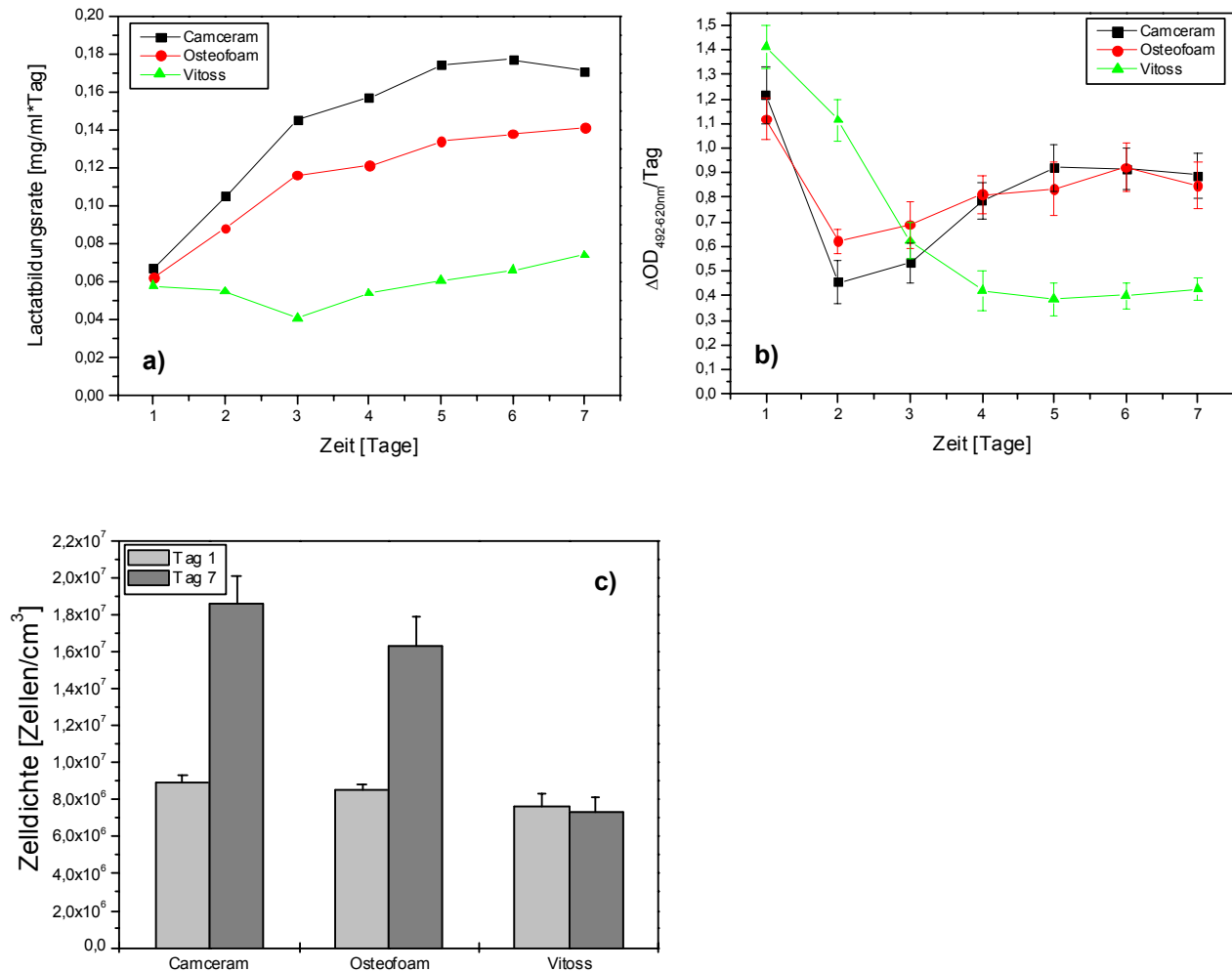


Daten, so entspricht dieser Wert etwa dem Differenzierungsstatus, den die Zellen vier Tage nach Konfluenz erreicht haben. Die Vergleichbarkeit dieser Daten vorausgesetzt, kann man davon ausgehen, dass bei einer Besiedlungsdichte von  $1 \cdot 10^7$  Zellen pro Träger, die Zellen annähernd konfluent ausgesät werden. Die besiedelbare Fläche eines Camceram-Trägergerüsts liegt etwa bei  $0,04 \text{ m}^2/\text{g}$  (B. Schnitter, Mnemoscience, Aachen, pers. Mitteilung). Bei einem durchschnittlichen Gewicht der Trägergerüste von  $0,3 \text{ g}$  liegt die besiedelbare Fläche demnach bei ca.  $120 \text{ cm}^2$  pro Trägergerüst. Die Besiedlungsdichte bei einer Animpfdichte von  $1 \cdot 10^7$  Zellen pro Träger und einer durchschnittlichen Besiedlungseffizienz von 85% lag damit bei ca.  $7,1 \cdot 10^4 \text{ Zellen/cm}^2$ . In Flaschenkultur lag die Zelldichte bei einem konfluenten Monolayer von osteogenen Rattenzellen bei zwischen  $8 \cdot 10^4$  und  $1 \cdot 10^5 \text{ Zellen/cm}^2$ . Je nach Besiedlungseffizienz kann also davon ausgegangen werden, dass die Zellen bei einer Besiedlungsdichte von  $1 \cdot 10^7$  Zellen pro Träger auf den Trägergerüsten spätestens 2-3 Tage nach der Besiedlung Konfluenz erreichen.

Für die nachfolgenden Experimente wurde die höchste Besiedlungsdichte von  $1 \cdot 10^7$  Zellen pro Träger gewählt. Ausschlaggebend hierfür war die schnellere Differenzierung bei dieser Besiedlungsdichte. Aufgrund der langen Differenzierungsphase und der Inprozessanalytik, die bei dem Nachweis von ECM-Komponenten wie Osteocalcin an der Detektionsgrenze liegt, erschien die hohe Besiedlungsdichte für die weiteren Experimente als die richtige Wahl. Es ist aber nicht auszuschließen, dass eine niedrigere Besiedlungsdichte für die spätere Herstellung von Knochenimplantaten günstiger ist, da hierbei eine intensivere Proliferation auf dem Trägergerüst selbst zu erwarten ist.

### 3.3.2 Vergleich unterschiedlicher Trägergerüste

Zum Vergleich der drei zur Verfügung stehenden Trägergerüste wurden diese mit einer Zelldichte von  $1 \cdot 10^7 \text{ Zellen/cm}^3$  besiedelt. Der kubische Camceram-Träger aus einem HA/ $\beta$ -TCP-Gemisch hat ein Volumen von  $1 \text{ cm}^3$ , der zylindrische Osteofoam-Träger aus 75/25 PLGA hat ein Volumen von  $0,75 \text{ cm}^3$  und der ebenfalls zylindrische Vitoss-Träger aus  $\beta$ -TCP hat ein Volumen von  $1,1 \text{ cm}^3$ . Die Trägergerüste wurden nach der Besiedlung für 7 Tage in 30 ml Proliferationsmedium (ZKT-I, 1% FBS, bFGF, PDGF-BB, Insulin, Transferrin, Albumin, Pen/Strep, L-Ascorbat-2-Phosphat,  $\beta$ -Glycerophosphat, Dexamethason) inkubiert. Nach 4 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel.



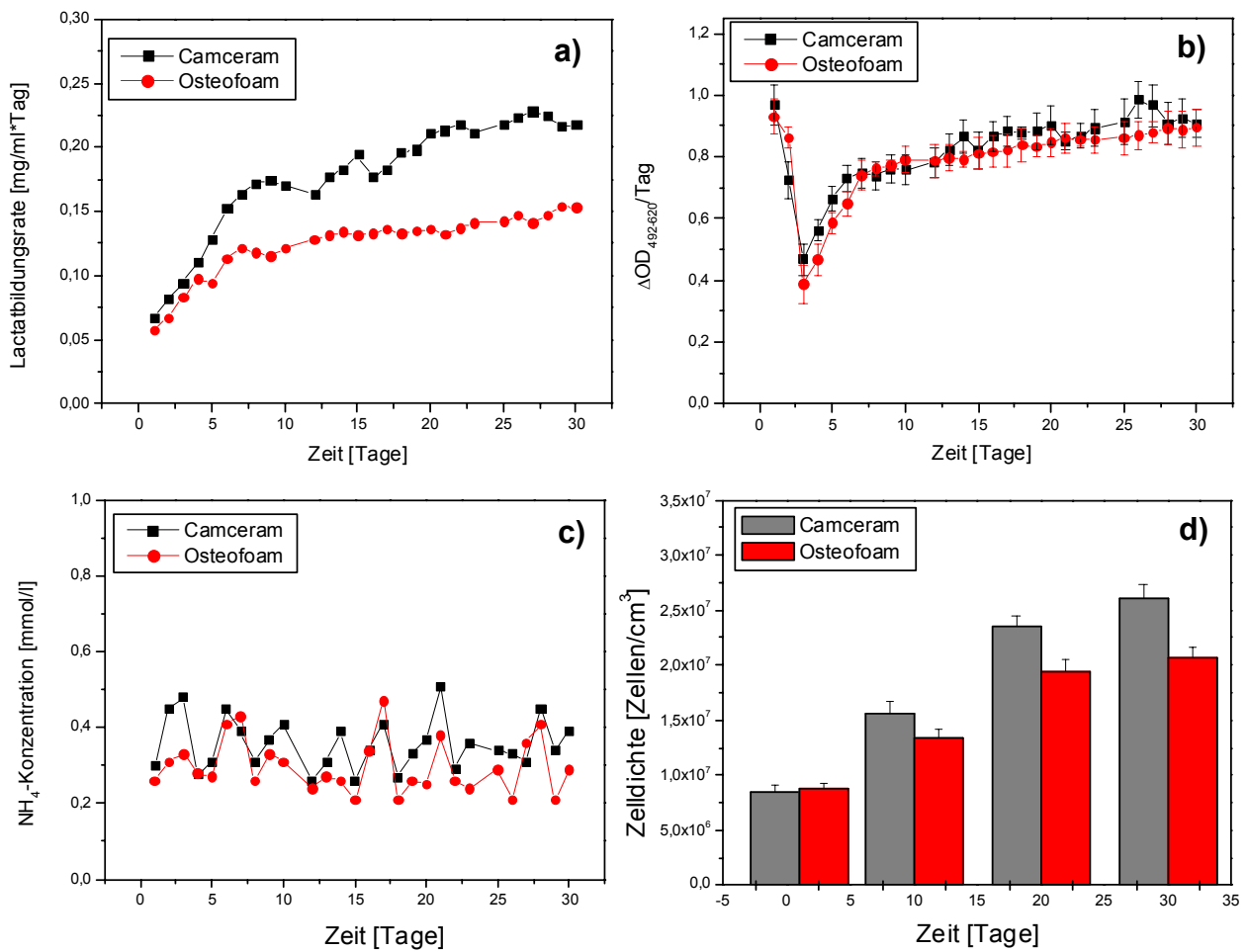
**Abbildung 3.20:** Vergleich verschiedener Trägermaterialien: Camceram (HA/ $\beta$ TCP-Gemisch, Camimplants), Osteofoam (75/25-PLGA, Bonetec), Vitoss ( $\beta$ TCP, Orthovita) auf Lactat- (a) und LDH- (b) Freisetzungsrate sowie Zellproliferation (c) während der siebentägigen statischen Kultur von osteogenen Rattenzellen.

Zum Vergleich des Zellwachstums auf den 3 unterschiedlichen Trägergerüsten wurden die Lactatbildungsrate, die LDH-Freisetzungsrate sowie die Anfangs- und die Endzelldichte bestimmt (Abb. 3.20 a-c). Dabei zeigte sich, dass die Zellen auf dem Vitoss-Träger trotz einer vergleichbaren primären Adhärenz während der ersten zwei bis drei Tage der Kultur eine Phase durchliefen, in der deutlich mehr Zellen abstarben, als gebildet wurden. Die Lactatbildungsrate ging in dieser Phase zurück und die LDH-Werte im Medium waren deutlich höher als in den beiden anderen Kulturen mit Osteofoam und Camceram. Allerdings war auch hier ein stark erhöhter LDH-Wert an Tag 1 zu verzeichnen, der vermutlich zu einem großen Teil auf die Lyse der während der Besiedlung nicht adhärennten Zellen zurückzuführen war. Des Weiteren war für Osteofoam und Camceram sowohl ein Anstieg der Lactatbildungsrate als auch der LDH-Freisetzungsrate nachzuweisen. Beim

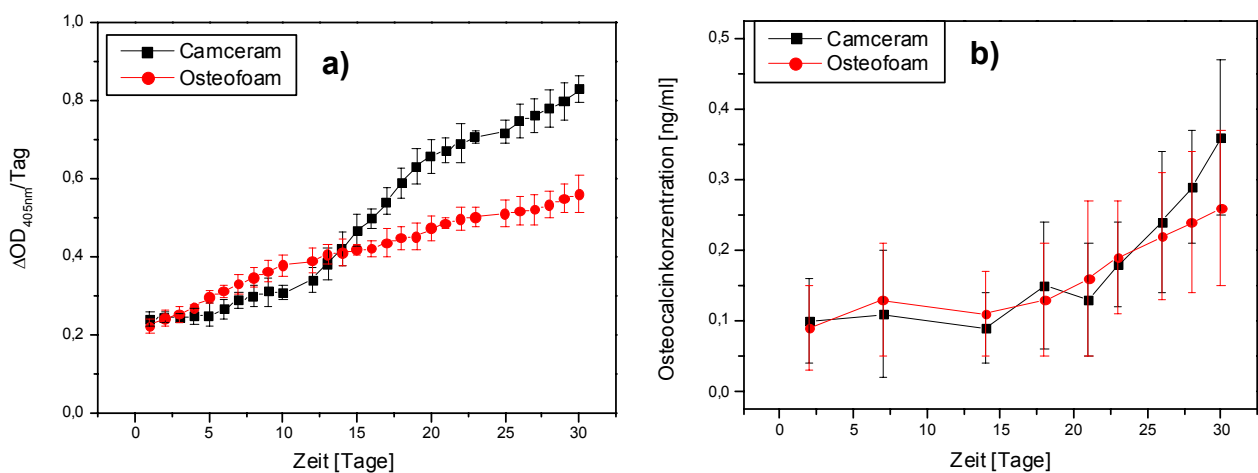
Vergleich der beiden Werte muss berücksichtigt werden, dass sich auf den kleineren Osteofoamträgern nur ca.  $6,4 \cdot 10^6$  Zellen befanden, während auf den Camceramgerüsten ca.  $8,9 \cdot 10^6$  nach der Besiedlung adhäriert waren. Die Besiedlungseffizienz war mit 89% bei den Camceram-Gerüsten geringfügig besser als bei den Osteofoam-Trägern mit 85%. Auch die auf das Gerüstvolumen bezogene Endausbeute der Zellen war mit  $1,86 \cdot 10^7$  Zellen/cm<sup>3</sup> bei Camceram höher als bei Osteofoam mit  $1,63 \cdot 10^7$  Zellen/cm<sup>3</sup> (Abb. 3.20 c). Die Zellproliferation auf beiden Trägergerüsten war deutlich schwächer als das subkonfluente Wachstum in 2D-Kultur (Abb. 3.3) mit einer Verdopplungszeit von ca. 50h und war eher dem Wachstums nach Erreichen der Konfluenz vergleichbar (Abb. 3.5, Proteinzunahme zwischen Tag 0 und 7 ca. um Faktor 2). Dies ist gut mit der Theorie korrelierbar, dass bei der gewählten Besiedlungsdichte die Zellen bereits fast konfluent auf dem Trägergerüst ausgesät wurden. Auf den Vitoss-Trägern ist nach siebentägiger Kultur weder eine Zunahme noch eine Abnahme der Zelldichte zu beobachten (Abb. 3.20 c). Die Mediendaten (Abb. 3.20 a und b) deuten allerdings an, dass in den ersten drei Tagen die Absterberate größer war als die Proliferationsrate. Danach muss sich die Kultur wieder erholt haben, so dass die Ausgangszelldichte bis Tag 7 wieder erreicht wurde. Dabei könnte die sehr variable Porengröße und die damit einhergehende reduzierte Interkonnektivität zwischen den Poren zu einer verminderten Versorgung derjenigen Zellen geführt haben, die in einer Tiefe von über 200 µm im Trägergerüst lokalisiert waren. Die an der Oberfläche lokalisierten Zellen konnten dagegen normal proliferieren. Das zur Füllung von kompakten Knochen produzierte  $\beta$ -TCP-Gerüst Vitoss soll zwar laut Herstellerangaben osteokonduktive Eigenschaften haben, ist aber nicht speziell für die *in vitro* Kultivierung von Knochenvorläuferzellen entwickelt worden. Im Vergleich erschienen Osteofoam und Camceram bei der *in vitro* Kultur von Knochenvorläuferzellen deutlich überlegen. Durch ihre offenporigere Struktur sind diese Trägergerüste auch besser für den geplanten Einsatz als perfundierbares Festbett in Bioreaktoren geeignet.

### 3.3.3 Vergleich von Proliferation und Differenzierung auf Camceram und Osteofoam in Langzeitkultur

Die Proliferation und Differenzierung wurde auf Camceram und Osteofoam in einer Langzeitkinetik über 30 Tage untersucht. Dazu wurden je vier Trägergerüste mit  $1 \cdot 10^7$  Zellen/cm<sup>3</sup> besiedelt und für 30 Tage in statischer Kultur in je 30 ml Medium in 50ml-Röhrchen kultiviert. Medienwechsel erfolgten alle 3 bis 4 Tage. Bis Tag 7 wurden die Zellen in Proliferationsmedium (ZKT-I, 1% FBS, bFGF, PDGF-BB, Insulin, Transferrin, Albumin, Pen/Strep, L-Ascorbat-2-Phosphat,  $\beta$ -Glycerophosphat, Dexamethason) kultiviert, danach wurde das Medium durch Differenzierungsmedium ohne bFGF und PDGF-BB ersetzt. Die Zellzahl wurde 12h nach der Besiedlung (Tag 0) sowie an den Tagen 10, 20 und 30 mithilfe der Hoechst 33258 DNA-Färbung nachgewiesen (Abb. 3.21 d). Zur täglichen Kontrolle des Zellwachstums wurden anhand von Medienproben der Lactat-, LDH- und Ammoniumgehalt (Abb. 3.21 a-c) bestimmt. Dabei ergab sich, dass die Zellen auch nach der Entfernung der beiden mitogenen Cytokine bFGF und PDGF-BB nach 7 Tagen auf beiden Trägergerüsten auch weiterhin deutlich proliferieren. Die erreichte Zellkonzentration pro Trägervolumen war bei Camceram deutlich höher als bei Osteofoam. Beim Vergleich der LDH- und Lactatwerte muss auch hier wieder beachtet werden, dass die absolute Zellzahl in den Camceram-Kulturen gegenüber den Osteofoam-Kulturen durch das größere Trägergerüstvolumen ca. um den Faktor 1,3 erhöht war. Während sich dieser Faktor in den Lactatbildungsraten widerspiegelte, sind die LDH- Werte fast identisch. Dies deutet darauf hin, dass die verminderte Zellausbeute auf den Osteofoam-Trägern möglicherweise durch ein erhöhtes Absterben der Zellen bedingt war. Die im Medium bestimmte Ammoniumkonzentration zeigte im gesamten Kulturverlauf keinen signifikanten Anstieg und kann daher bei der verwendeten Kultivierungsmethode und den eingesetzten Zellen als aussagekräftiger metabolischer Parameter oder als Einflussgröße mit toxischem Potenzial vernachlässigt werden.



**Abbildung 3.21:** Vergleich der Lactat- (a) und LDH-Bildung (b), Ammoniumkonzentration (c) und Zelldichte (d) osteogener Rattenzellen auf Osteofoam und dem Camceram in statischer Kultur.



**Abbildung 3.22:** Bestimmung von Differenzierungsparameter im Überstand statischer Kulturen osteogener Rattenzellen: a) Alkalische Phosphatase und b) Osteocalcin im Überstand.

Neben der Proliferation wurde auch die Differenzierung der Zellen mittels im Überstand messbarer Parameter untersucht (Abb. 3.22). Als früher Indikator für die Differenzierung wurde die lösliche Alkalische Phosphatase im Medium bestimmt (Abb. 3.22a). Als später Differenzierungsindikator diente die Bestimmung der Osteocalcinkonzentration im Überstand (Abb. 3.22b). Dabei zeigte sich vor allem, dass die Differenzierung im Vergleich mit 2D-Flaschenkulturen auf beiden Trägerarten sehr langsam ablief. Auf den Camceram-Trägern begann ein deutlicher Anstieg der AP-Konzentration erst nach zehn Tagen. Die Berechnung der zellspezifischen  $\Delta OD_{405}$ -Werte für die Tage 1, 10, 20 und 30 (Tabelle 3.3) zeigte sogar, dass die zellspezifischen AP-Werte im Verlauf der Kultur weitgehend konstant blieben.

Tab. 3.3: Vergleich der zellspezifischen AP-Entwicklung im Kulturüberstand

Tag	Camceram $\Delta OD_{405}/\text{Zellzahl}$ $\cdot 10^{-6}$	Osteofoam $\Delta OD_{405}/\text{Zellzahl}$ $\cdot 10^{-6}$
1	0,028	0,026
10	0,020	0,026
20	0,028	0,024
30	0,032	0,027

Obwohl bei beiden 3D-Kulturen nach 14 Tagen ein Anstieg der Osteocalcinkonzentration zu erkennen war, beweisen die sehr geringen Osteocalcinwerte, dass die Differenzierung selbst nach 30 Tagen noch nicht sehr weit fortgeschritten ist. Die gemessenen Werte liegen unterhalb von 0,5 ng/ml und liegen damit im Bereich der Messungenauigkeit des Testsystems.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der statischen Kultur auch im Langzeitversuch die Proliferation der Zellen gegenüber der Differenzierung deutlich überwog. Auf beiden Trägergerüsten ist selbst nach 20 Tagen noch eine Zunahme der Zelldichte zu verzeichnen. Gleichzeitig war eine stetige Zunahme der LDH-Freisetzung zu beobachten, was darauf hinweist, dass ein Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelllyse bestand. Insbesondere während der ersten zwei Tage der Kultur schien dabei die Zelllyse zu überwiegen. Die absolute Wachstumsrate der Zellen auf den Trägermaterialien ist gering. Jedoch konnte auf den Camceram-Trägern eine stärkere Proliferation festgestellt werden als auf den Osteofoam-

Trägern. Anhand der Messung der löslichen AP lässt sich vermuten, dass vor allem zu Beginn frühe osteogene Vorläuferzellen, die z.T. noch keine AP exprimieren, auf den Trägern proliferieren, da die zellspezifische lösliche AP während der Kultur weitgehend konstant blieb (Tab. 3.3). Der nur sehr schwache Anstieg der OC-Konzentration im Kulturüberstand zeigte, dass auch nach 20 Tagen nur sehr wenige reife Osteoblasten in der Kultur vorlagen. Nach 15 Tagen setzte die Differenzierung auf den Camceram-Trägern langsam ein, was daran abzulesen war, dass die Zunahme der löslichen AP deutlich schneller erfolgte als die Zunahme der Lactatbildungsrate. Die Zunahme der löslichen AP auf den Osteofoam-Trägern blieb hingegen etwa in der Größenordnung des Zellwachstums, die zellspezifische AP nimmt daher im Verlauf der Kultur weder signifikant zu noch ab, die Differenzierung schreitet hier demnach im Kulturverlauf nur minimal fort.

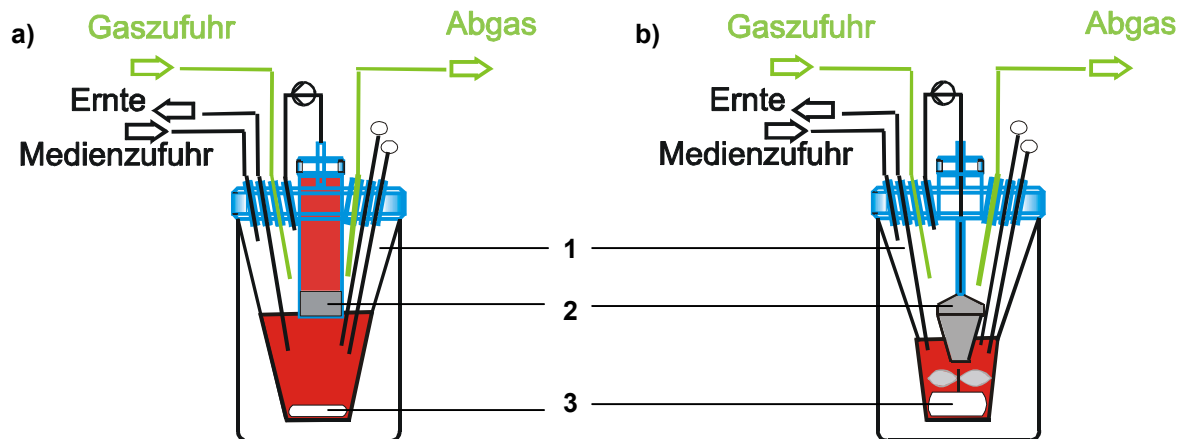
### **3.4 Reaktorversuche**

#### **3.4.1 Technische Charakterisierung**

Im Laufe der durchgeführten Experimente wurden eine Reihe verschiedener Reaktorkonfigurationen hinsichtlich ihrer Eignung für die Kultivierung von Knochenvorläuferzellen auf porösen Trägergerüsten getestet. Bei allen Änderungen der Gefäß- und Rührergeometrie wurde sowohl auf eine Verminderung des Reaktorvolumens als auch auf eine Beschleunigung des Gaseintrags bei gleichzeitiger Verminderung der Rührerdrehzahl hingearbeitet.

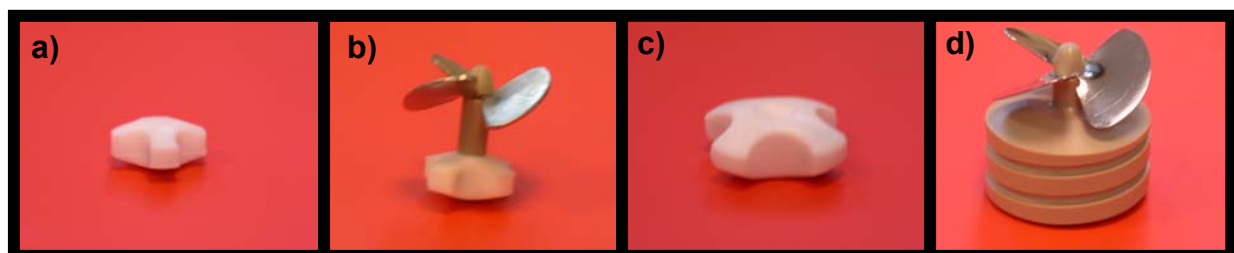
Die Verminderung des Reaktorvolumens von anfänglich mehr als 80 ml auf ca. 30 ml (Abb. 3.23) ist vor allem aus zwei Gründen vorteilhaft: Erstens wird so eine bessere und schnellere Eigenkonditionierung des Mediums erreicht zweitens sind sowohl die metabolische Aktivität der Zellen und die Expression spezifischer Differenzierungsmarker nachweisbar.

Die Zellkonzentration pro ml Kulturmedium steigt bei konstanter Besiedlungsdichte des Trägergerüsts um denselben Faktor um den das Medienvolumen reduziert wird. Entsprechend nimmt die Konzentration der von den Zellen produzierten Medienbestandteile zu. Dies verstärkt nicht nur den Effekt der Eigenkonditionierung des Mediums, sondern erleichtert den Nachweis von knochenspezifischen Faktoren im Medium. Gerade bei instabilen und kleinen Proteinen wie Osteocalcin, die bei gängigen Aufkonzentrierungsverfahren schnell die aktive Konformation verlieren, wird so die Nachweisgrenze deutlich gesenkt.



**Abbildung 3.23:** Schematische Darstellung der technischen Änderungen des Reaktorsystems zur Verminderung des Kulturvolumens von mehr als 80 ml (a) auf 30 ml (b) durch Änderungen der Geometrie des Reaktorinnengefäßes (1), des Trägergerüsthalters (2) und des Rührers (3).

Zur Verminderung des Medienvolumens wurde die Gefäßgeometrie der Ausgangskonfiguration verändert. Die ursprüngliche Konfiguration enthielt ein Glasrohr, in dem der Festbetthalter durch einen O-Ring verankert war. Das eingesetzte Glasrohr hatte ein Volumen von knapp 10 ml, die bei interner Umwälzung mit Medium gefüllt waren. Durch den Ersatz dieses Glasrohrs durch ein Metallrohr mit einem Durchmesser von 3 mm, an dessen unteren Ende eine PEEK-Kammer für das Festbett angebracht ist, konnte das Volumen von 10 auf unter 1 ml reduziert werden. Die Festbettkammer wurde zudem weiter abgesenkt, so dass die Füllstandshöhe im Glasinnengefäß erheblich gesenkt werden konnte. Die ursprünglich konischen Wandungen des Glasinnengefäßes wurden zur Volumenreduzierung im unteren Bereich in eine zylindrische Form gebracht. Des Weiteren wurde ein voluminöser Rührfisch verwendet, der durch seine Medienverdrängung eine zusätzlich Reduzierung des Gesamtvolumens ermöglichte.

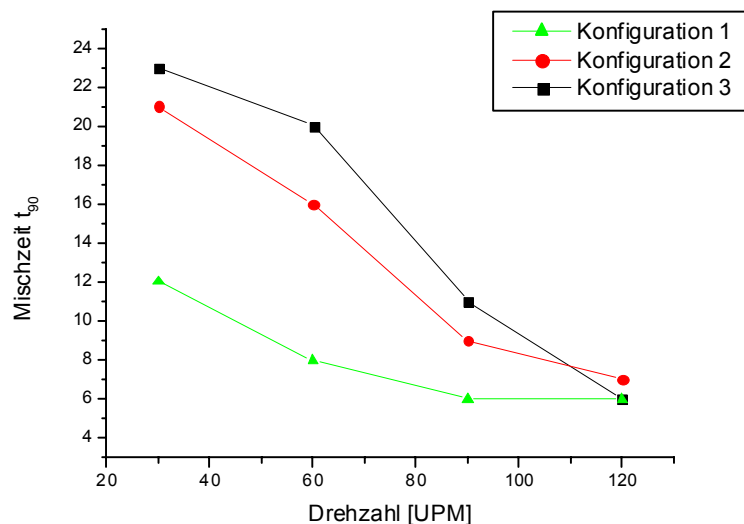


**Abbildung 3.24:** Änderungen der Rührfischkonfiguration: a) kommerziell erhältlicher Kreuzrührer (Durchmesser 19 mm), b) Kreuzrührer mit aufgesetztem Propellerrührer, c) kommerziell erhältlicher Kreuzrührer (Durchmesser 35 mm), d) an den Fermenter angepasstes Rührelement aus PEEK mit aufgesetztem Propellerrührer.

Die beschriebenen Änderungen wurden sukzessive in mehreren Modifikationen des Reaktorgefäßes vorgenommen. Auch der eingesetzte Rührfisch wurde mehrfach gewechselt. Zunächst wurde der in Abb. 3.24a dargestellte Rührfisch verwendet. Um



bei gleicher Rührerdrehzahl eine höhere Durchmischung zu erreichen wurde dieser durch einen aufgesetzten Propellerrührer ergänzt (Abb. 3.24b). Durch Vergrößerung des Grundkörpers des Magnetrührers sollte dann eine stärkere Medienverdrängung erreicht werden (Abb. 3.24c). Letztlich wurde der dargestellte Grundkörper durch einen aus PEEK geformten zylindrischen Grundkörper ersetzt, der das konische Reaktorgefäß weitgehend ausfüllte (Abb. 3.24d).



**Konfiguration 1:** Normales konisches Reaktorinnengefäß, kleinvolumiger Kreuzrührer ohne Aufsatz, Medienvolumen 60 ml.

**Konfiguration 2:** Normales konisches Reaktorinnengefäß; Rührfisch: großvolumiger Kreuzrührer mit aufgesetztem Propellerrührer; Medienvolumen 60 ml.

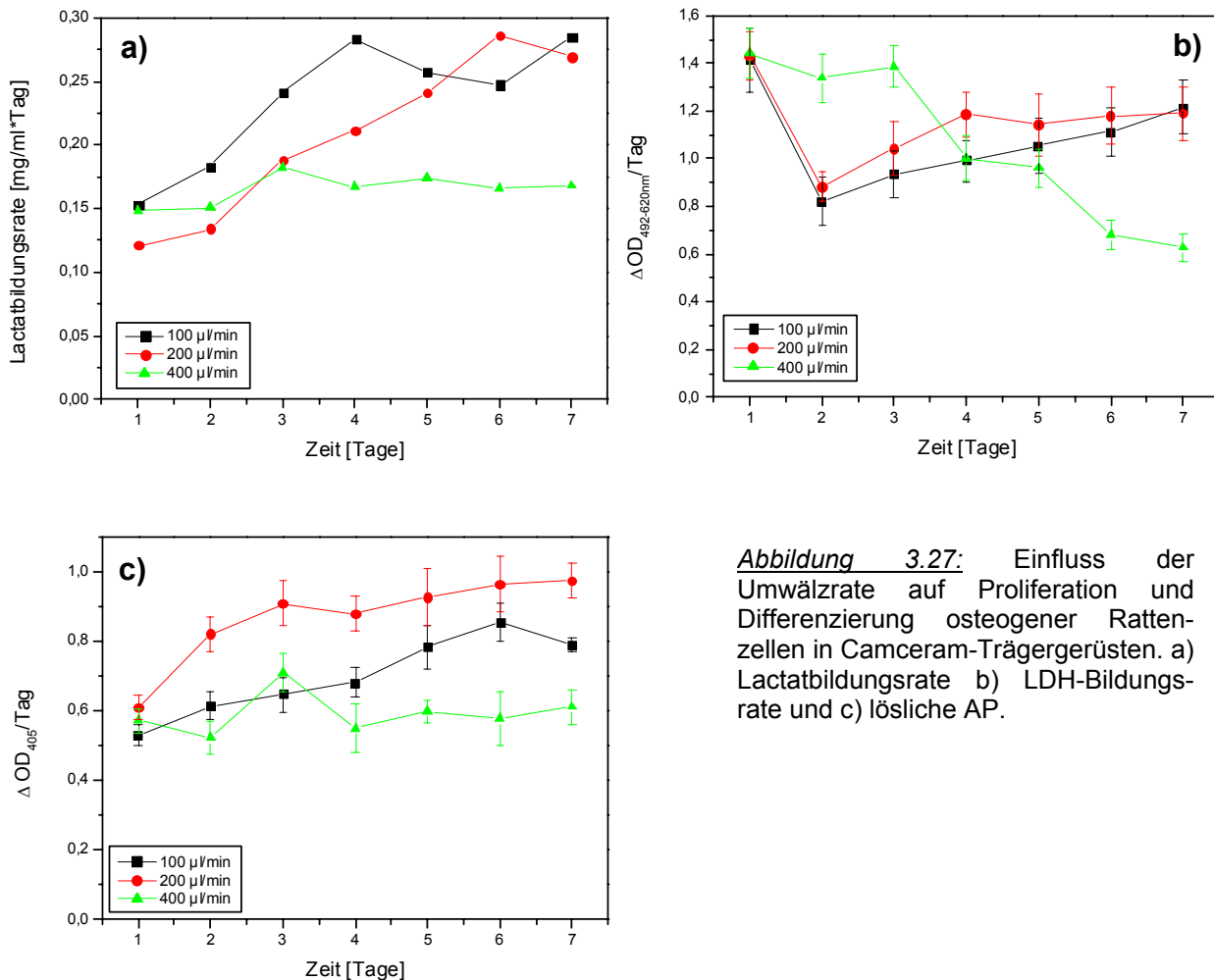
**Konfiguration 3:** Konisches Reaktorinnengefäß mit verlängertem zylindrischen Abschnitt; Rührelement: großvolumiger zylindrischer Grundkörper mit aufgesetztem Propellerrührer; Medienvolumen 30 ml.

**Abbildung 3.25:** Untersuchung der drehzahlabhängigen Mischzeit in verschiedenen Reaktorkonfigurationen anhand einer pH-Messung nach Säurezugabe.

Bei der Untersuchung der Mischzeit (Abb. 3.25) ergab sich, dass das in Aufbau 3 verwendete leichtere und widerstandsfreiere Rührelement bereits bei kleineren Drehzahlen gute Durchmischungsergebnisse erzielte. Die großvolumigeren Rührelemente benötigten eine höhere Drehzahl, um die nötige Laufruhe zu erreichen. In allen drei getesteten Reaktorkonfigurationen wurden allerdings bereits bei 90 UPM Mischzeiten um 10 s erreicht. Bei einer Rührerdrehzahl von 120 UPM lagen die Mischzeiten sogar unter 8 s und damit im Bereich der Reaktionszeit der pH-Sonde von ca. 3-4 s. Das Reaktorgefäß kann also in guter Näherung bei einer Rührerdrehzahl von 120 UPM in den drei betrachteten Konfigurationen als ideal durchmischt angesehen werden.

### 3.4.2 Optimierung der internen Umwälzung

Zur Untersuchung des Einflusses der internen Umwälzrate (Abb. 3.27 u. 3.28) auf die Proliferation osteogener Rattenzellen auf Camceram-Trägern wurde ein  $pO_2$  von 40% Luftsättigung eingestellt.



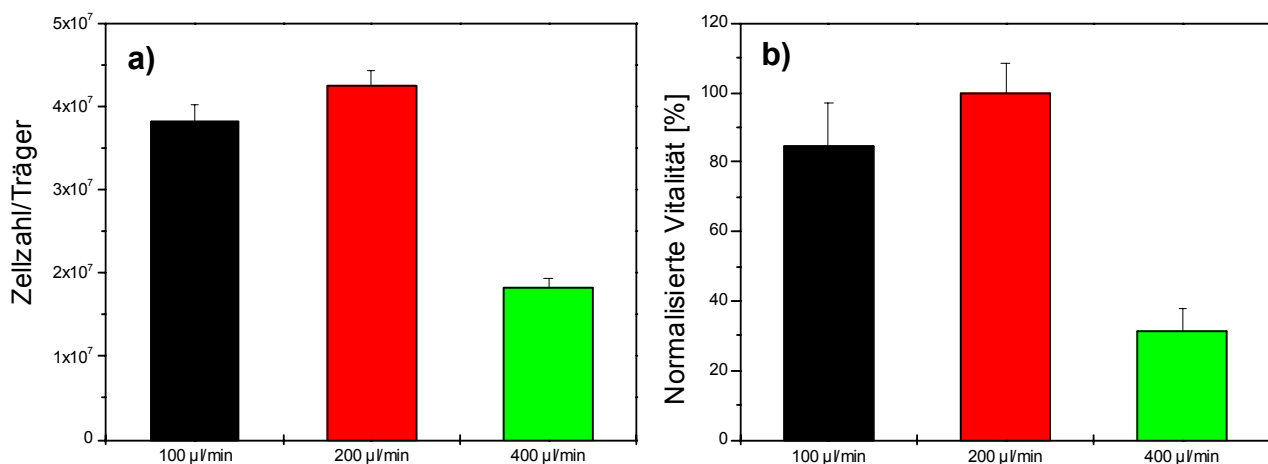
**Abbildung 3.27:** Einfluss der Umwälzrate auf Proliferation und Differenzierung osteogener Rattenzellen in Camceram-Trägergerüsten. a) Lactatbildungsrate b) LDH-Bildungsrate und c) lösliche AP.

Je ein Bioreaktor einer Dreifachstation wurde mit einer internen Umwälzung von 100, 200 und 400  $\mu\text{l}/\text{min}$  betrieben. Die Bestimmung der Alkalischen Phosphatase (AP) im Medium (Abb.3.27c) zeigte eine relative Zunahme der löslichen AP im Laufe der Kultur bei den Umwälzraten 100 und 200  $\mu\text{l}/\text{min}$ , während sie bei einer Umwälzrate von 400  $\mu\text{l}/\text{min}$  stabil blieb. Auch die Lactatbildungsrate (Abb. 3.27a) nahm in den Bioreaktoren mit Umwälzraten von 100 und 200  $\mu\text{l}/\text{min}$  deutlich zu. Bei einer Umwälzrate von 400  $\mu\text{l}/\text{min}$  war dagegen nur ein geringer Anstieg der Lactatbildung zu verzeichnen.

Die Analytik der LDH-Freisetzungsrate im Überstand (Abb. 3.27b) zeigte, dass im Gegensatz zu Umwälzraten von 100 und 200  $\mu\text{l}/\text{min}$  die LDH-Freisetzung bei einer

Umwälzrate von 400 µl/min zu Beginn des Versuches stark erhöht war. Während die LDH-Freisetzung im Laufe der Fermentation bei niedrigeren Umwälzraten leicht anstieg, fiel sie bei der hohen Umwälzrate nach drei Tagen deutlich ab.

Die Zellzahl und Vitalitätsbestimmung im Träger zum Ende der Kultivierung an Tag 7 (Abbildung 3.28) zeigte ebenfalls, dass sowohl Zellzahl als auch Vitalität in dem Träger, der bei einer Umwälzrate von 400 µl/min kultiviert wurde, deutlich geringer ausfielen als bei beiden Trägergerüsten mit niedrigeren Umwälzraten.



**Abbildung 3.28:** Bestimmung der Zellzahl(a) und Vitalitäts (b) nach Beendigung der Bioreaktorkultur von osteogenen Rattenzellen auf Camceram-Trägergerüsten an Tag 7.

Im Laufe der Kultivierung konnte bei den beiden niedrigeren Umwälzraten eine Vermehrung der Zellen auf dem Träger etwa um den Faktor 4 erreicht werden. Dagegen war bei der internen Perfusion des Festbettes mit 400 µl/min nicht einmal eine Verdopplung der Zellzahl zu beobachten.

Dies lässt zusammenfassend darauf schließen, dass niedrigere Umwälzraten für die Versorgung der Zellen im Festbett ausreichen und zu besseren Ergebnissen führten. Möglicherweise kam es bei erhöhter Fließgeschwindigkeit des Mediums im Trägergerüst zum Aufbau von Scherkräften insbesondere in den Bereichen kleinerer Porengröße und den interkonnektierenden Kanälen. Diese könnten zu einer verstärkten Ablösung der Zellen vor allem zu Beginn der Kultivierung geführt haben. Eine dadurch stark erniedrigte Zelldichte auf dem Träger kann zu einem verminderten Wachstum der verbliebenen Zellen geführt haben.

Die Zellproliferation und auch die aus der Messung der löslichen AP abzuschätzende Differenzierung der Zellen bei den beiden geringen Umwälzraten war dagegen als positiv zu bewerten. Die ansteigende LDH-Konzentration im Überstand deutete

allerdings daraufhin, dass auch das zu verzeichnende Zellwachstum von einem ständigen Absterben eines gewissen Anteils der Zellen begleitet war. Da vergleichbare Werte auch in der 2D-Kultur in T25-Flaschen gemessen wurden, kann dieser Anstieg allerdings nicht als Ausbildung von nekrotischen Zonen in den Trägergerüsten gedeutet werden. Es war vielmehr zu beobachten, dass eine kontinuierlich erhöhte LDH-Freisetzung immer mit einem Anstieg der Zelldichte korrelierbar war.

Die Zunahme der Lactatbildung als metabolischer Parameter und die gute Übereinstimmung der Werte aus Vitalitäts- und Zellzahlmessung wiesen ebenfalls daraufhin, dass die im Träger befindlichen Zellen ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt wurden.

Als Konsequenz aus den erhaltenen Daten wurde in folgenden Experimenten eine Umwälzrate von 200 µl/min zur internen Perfusion des Festbettes gewählt.

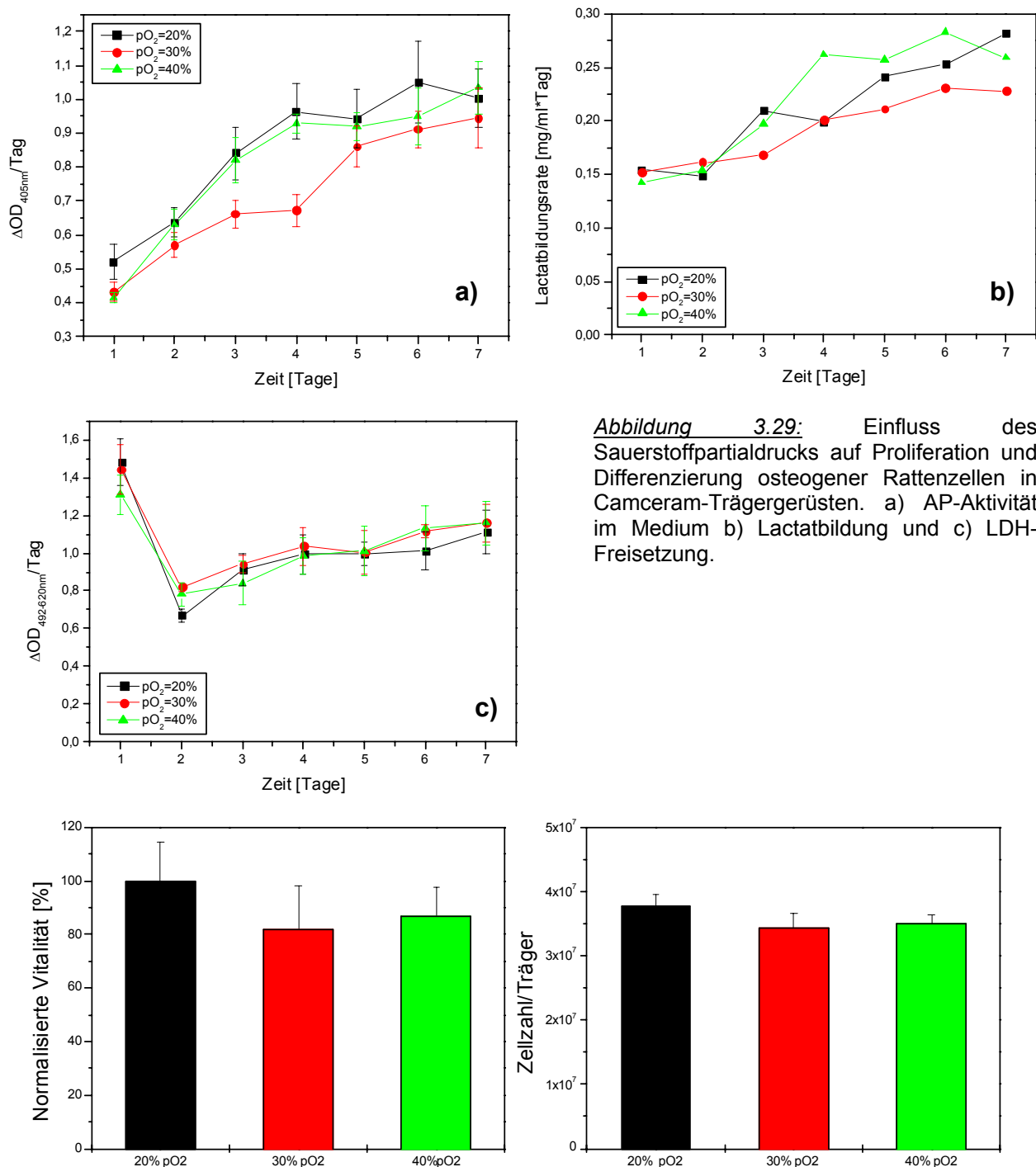
### **3.4.3 Einfluss des Sauerstoffgehaltes**

Zur Überprüfung des Einflusses des Sauerstoffgehaltes auf die Proliferation der Zellen wurde der unter 3.4.2 beschriebene Versuchsaufbau mit drei parallel laufenden Bioreaktoren wiederholt. Die Begasungsrate lag bei 20 ml/min und die interne Umwälzrate bei 200 µl/min. Die Camceram-Trägergerüste wurden wie beschrieben sterilisiert und mit  $1 \cdot 10^7$  Zellen pro Träger besiedelt. Im Regelbetrieb wurden drei verschiedene Sauerstoffgehalte als Sollwert eingestellt: 20%, 30% und 40% Luftsättigung.

Die Analyse des Kulturüberstands (Abb.3.29) zeigte keinen deutlichen Einfluss des Sauerstoffgehaltes der Kopfraumbegasung. Die Abweichungen zwischen den einzelnen Bioreaktoren lagen sowohl bei LDH- und Lactatmessung als auch bei der Bestimmung der löslichen AP im Bereich der Fehlergrenzen.

Auch die nach Beendigung des Versuches durchgeführte Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung (Abb. 3.30) der Trägergerüste erbrachte keine signifikanten Abweichungen zwischen den Versuchsansätzen. Darüber hinaus konnte in keinem der drei Fälle eine messbare Erhöhung des Prozentsatzes des eingespeisten Luftsauerstoffs im Laufe der siebentägigen Kultur verzeichnet werden, obwohl in allen Trägergerüsten ein Anstieg der Zellzahl auf über  $3 \cdot 10^7$  Zellen festgestellt werden konnte.

Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch ein Sauerstoffgehalt von nur 20% Luftsättigung im gewählten Versuchsaufbau ausreicht, um die im Trägergerüst befindlichen Zellen zu versorgen. Anzumerken ist darüber hinaus, dass sich ein erhöhter Sauerstoffgehalt im Medium offensichtlich nicht durch oxidative Prozesse negativ auf die Zellproliferation und Differenzierung auswirkte.

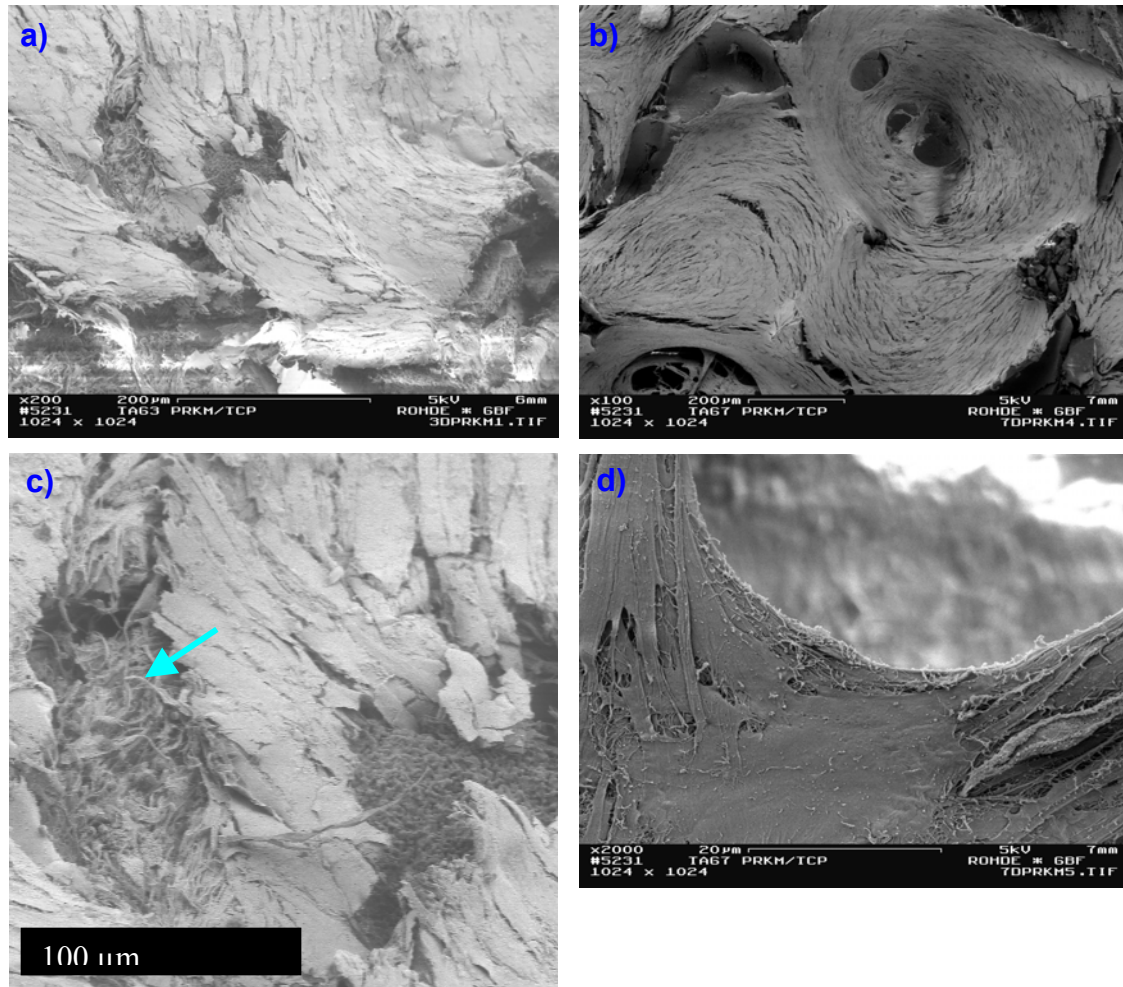


**Abbildung 3.29:** Einfluss des Sauerstoffpartialdrucks auf Proliferation und Differenzierung osteogener Rattenzellen in Camceram-Trägergerüsten. a) AP-Aktivität im Medium b) Lactatbildung und c) LDH-Freisetzung.

**Abbildung 3.30:** Vitalitäts-(a) und Zellzahlbestimmung (b) nach Beendigung der Bioreaktorkultur von osteogenen Rattenzellen auf Camceram-Trägergerüsten an Tag 7.

### 3.4.4 Zellverteilung im Trägergerüst

Zur Untersuchung der Zellproliferation auf Camceram-Trägern im Bioreaktor wurde eine weitere Kultur mit diskontinuierlichem Mediumwechsel bei zwei parallel laufenden Bioreaktoren durchgeführt. Dabei wurden keine abweichenden Einstellungen zwischen den Einzelfermentern vorgenommen. Vielmehr wurde eine Bioreaktorkultur bereits nach drei Tagen, die andere nach sieben Tagen beendet und die erhaltenen Proben elektronenmikroskopisch untersucht.



**Abbildung 3.31:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von besiedelten Camceram-Trägern nach 3 (a/c) und 7 (b/d) Tagen Kultur im Bioreaktor mit 200 µl/min interner Umwälzung, pO<sub>2</sub> 20% Luftsättigung, 20ml/min Begasungsrate, diskontinuierlicher Mediumwechsel.

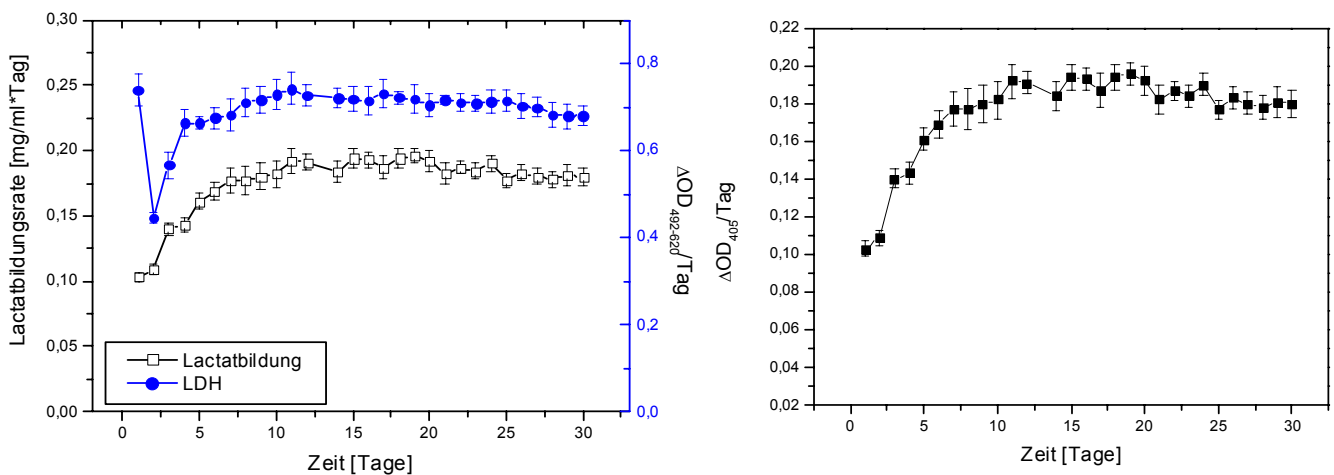
Die fixierten und gewaschenen Träger wurden mittig auseinandergebrochen und nach der Präparation für die EM-Aufnahmen im Querschnitt betrachtet. Dabei zeigte sich ein fast durchgängige Besiedlung des Trägergerüsts bereits nach drei Tagen (Abbildung 3.31a). Darüber hinaus ist bereits zu diesem frühen Zeitpunkt eine von den Zellen gebildete Matrix aus Kollagenfibrillen zu erkennen (Abbildung 3.31c, Pfeil). Die Kollagenmatrix wird direkt auf der TCP/HA-Oberfläche unterhalb des

Zelllayers abgelegt. Nach sieben Tagen ist eine fast lückenlose Auskleidung der makroporösen Struktur des Trägergerüsts zu erkennen (Abb. 3.31 b,d). Die EM-Aufnahmen zeigen einen repräsentativen Ausschnitt aus dem Innern der Trägermaterialien. Dies lässt darauf schließen, dass eine Versorgung der Zellen auch im Innern des Trägergerüsts durch die Perfusion des Gerüsts gewährleistet ist. Die einheitliche und dichte Besiedlung des Trägergerüsts auch nach einem längeren Zeitraum der *in vitro* Kultur ist eine grundlegende Voraussetzung für die Züchtung von vitalen Knochenimplantaten. Die ebenfalls zu erkennende Bildung der Kollagenmatrix zeigt zudem, dass die in der 3D-Kultur wachsenden Zellen eine osteogene Differenzierung durchlaufen und die für die Herstellung eines funktionalen Implantates sehr wichtige knochenspezifische Matrix synthetisieren.

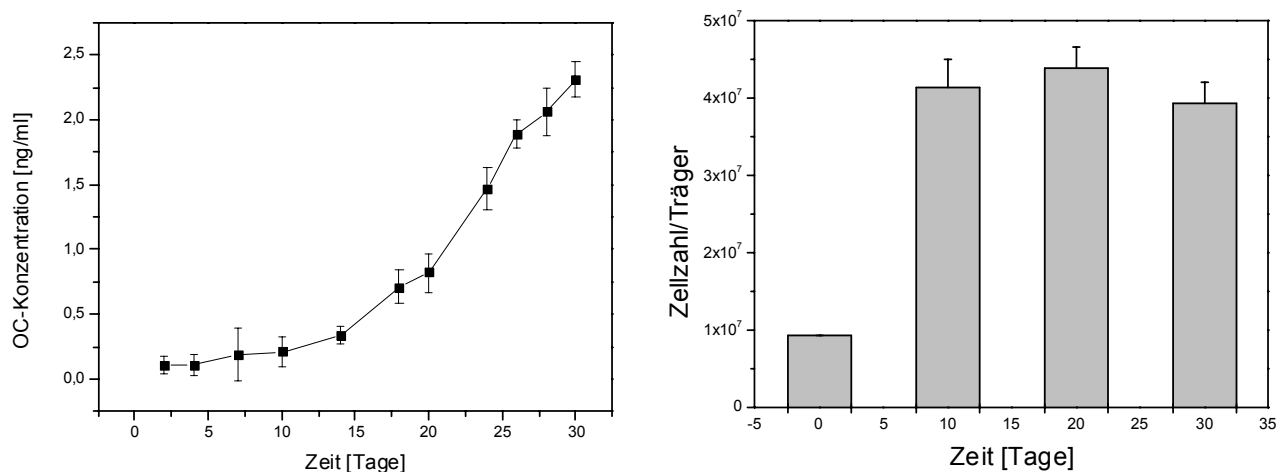
### 3.4.5 Bioreaktorkultur mit kontinuierlichem Mediumwechsel

Zur Langzeitkultur osteogener Zellen in Bioreaktoren über mehr als 7 Tagen eignet sich eine Perfusionskultur mit kontinuierlichem Medienaustausch besser als die bisher angewendete Kultivierung mit diskontinuierlichem Medienaustausch. Einerseits wird so die Prozedur des Medienwechsels vermieden, die nicht nur zu einer Unterbrechung des Kultivierungsprozesses führt, sondern aufgrund des Fermenteraufbaus trotz der Durchführung unter einer Sterilwerkbank ein Kontaminationsrisiko birgt. Andererseits wird durch den kontinuierlichen Medienaustausch sowohl die Anreicherung von cytotoxischen Abfallprodukten des Zellmetabolismus verhindert als auch ein permanente Zufuhr von Nährstoffen, Cytokinen und Supplementen gewährleistet. Bei der Langzeitkultur wird während der ersten sieben Tage das mit osteogenen Faktoren und mitogenen Cytokinen supplementierte Proliferationsmedium aus der Vorlagenflasche zugeführt. Ab Tag 7 erfolgt eine kontinuierliche Abreicherung der Cytokine bFGF und PDGF-BB im Reaktor, indem bFGF- und PDGF-BB-freies Differenzierungsmedium vorgelegt wird. Bei einer Perfusionsrate von 10 ml pro Tag sollten diese an Tag 10 weitgehend aus dem Bioreaktor entfernt worden sein.

Begasungsrate:	20 ml/min
pO <sub>2</sub> :	20% Luftsättigung
Interne Umwälzung:	200 µl/min
Perfusionsrate:	7 µl/min



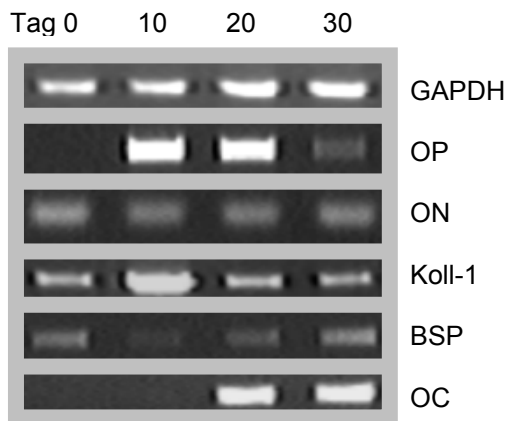
**Abbildung 3.32:** Medienanalytik der Perfusionskultur von besiedelten Camceramträgern. a) Vergleich der Lactatbildungsrate und LDH-Freisetzungsrate. b) Bestimmung der löslichen Alkalischen Phosphatase.



**Abbildung 3.33:** a) Bestimmung der Osteocalcin-Konzentration im Medium b) Bestimmung der Zellzahl im Trägergerüst durch DNA-Fluoreszenzfärbung mit Hoechst 33258.

Der Kultivierungsprozess wurde von einer täglichen Analyse des Kulturüberstandes begleitet. Dabei wurde neben löslicher AP, Lactatproduktionsrate und LDH-Freisetzungsrate auch der späte Differenzierungsmarker Osteocalcin bestimmt. Die Bestimmung erfolgte mit einem Rattenosteocalcin ELISA. Die Kontrolle von 30 Medienproben in Doppelbestimmung war aus finanziellen Gründen nicht möglich. Es wurde daher eine Auswahl von zu analysierenden Proben mit einem Schwerpunkt auf der späten Phase der Kultivierung getroffen.





*Abbildung 3.34:* Ergebnisse der RT-PCR der im Verlauf der Perfusionskultur aus Trägermaterial Camceram isolierten Zellen. GAPDH=Glycerinaldehyd-Dehydrogenase, ubiquitär exprimiertes Gen der Glycolyse zum semiquantitativen Abgleich der eingesetzten cDNA-Menge; OP=Osteopontin, ON=Osteonectin, Koll-1=Kollagen 1; BSP= Bone Sialo Protein; OC=Osteocalcin.

Neben der nicht-invasiven Medienanalytik wurde nach Beendigung je eines Bioreaktorlaufes nach 10, 20 und 30 Tagen das besiedelte Trägergerüst analysiert. Dazu wurde nach der Homogenisation ein Drittel des Homogenisats zur Bestimmung der Zellzahl mittels DNA-Fluoreszenzfärbung mit Hoechst 33258 eingesetzt. Aus den verbliebenen zwei Dritteln des Homogenisats wurde mithilfe von Trizol die RNA isoliert und zur RT-PCR eingesetzt, um auf Transkriptionsebene nach gängigen Knochenmarkern zu suchen. Als Nullkontrolle (Tag 0) wurde darüber hinaus ein frisch besiedeltes Trägergerüst nach der 12stündigen Adhäsionsphase zur Zellzahlbestimmung und RNA-Isolation verwendet.

Die Daten der Lactatbildungsraten (Abb. 3.32a) deuteten als metabolischer Parameter an, dass nach einer rapiden Wachstumsphase zu Beginn die Zellzahl im Trägergerüst weitgehend konstant blieb. Dagegen wies die gleichbleibend hohe LDH-Freisetzungsrate (Abb. 3.32a) daraufhin, dass auch nach der Wachstumsphase ein gewisser Anteil der Zellen lysiert. Zusammen genommen ließ dies darauf schließen, dass auch nach Tag 7 weiter neue Zellen gebildet wurden, während andere abstarben. Der hohe Anfangswert der LDH-Konzentration lässt sich entweder dadurch erklären, dass in der Adhäsionsphase nicht adhärierte Zellen durch die interne Umwälzung aus dem Träger ausgewaschen werden und lysieren oder dass während der Einbringung des Trägers in den Fermenter eine erhöhte Zahl von Zellen absterben. Hierbei ist anzunehmen, dass das Auswaschen von nicht adhärierten Zellen den überwiegenden Anteil an der LDH-Freisetzung hat, da diese den Träger während der statischen Adhäsionsphase nicht quantitativ verlassen können. Das Einbringen des Trägergerüsts in den Bioreaktor ist zudem weitgehend frei von mechanischen oder anderen physiologischen Belastungen für die Zellen.

Die lösliche Alkalische Phosphatase stieg die ersten 8-10 Tage an und blieb im weiteren Verlauf der Kulturführung in dem erreichten Plateau (Abb. 3.32b). Auch mit Beginn der Bildung des Osteocalcins nach Tag 10 (Abb. 3.33a) nahm die Konzentration der löslichen AP nicht ab. Da OC-positive Zellen in der Regel keine AP mehr exprimierten, deutete dies daraufhin, dass auch in der späteren Kultivierungsphase eine Mischkultur aus unterschiedlichen Differenzierungsstadien im Trägergerüst vorlag. Die OC-Konzentration nahm nach Tag 10 kontinuierlich zu, woraus eine fortschreitende Differenzierung der Zellen hin zu mineralisierenden Osteoblasten gefolgert werden konnte. Die absolute Konzentration des Osteocalcins im Medium lag allerdings auch zu den späteren Zeitpunkten der Kultur noch deutlich im unteren Nachweisbereich des eingesetzten ELISAs. Aufgrund der Tatsache, dass Osteocalcin ein hauptsächlich in die extrazelluläre Matrix eingelagertes Protein darstellt, war seine geringe Konzentration im Medium allerdings nicht überraschend. Die aus der DNA-Quantifizierung (Abb. 3.33b) gewonnenen Daten zeigten, dass die Proliferationsphase bereits nach 10 Tagen abgeschlossen war und die Zellzahl im Träger anschließend weitgehend konstant blieb. Diese mit der invasiven Methode der Zell-DNA-Färbung gewonnenen Daten waren mit den aus der Lactatbildungsrate gewonnenen Erkenntnissen im Einklang.

Die Analyse der knochenspezifischen Marker auf Transkriptebene (Abb. 3.34) unterstützte die Annahme, dass die Zellen auf den Trägern differenzierten. Osteonectin und Kollagen-I wurden während des gesamten Kultivierungsprozesses exprimiert. Die Expression von Osteopontin wurde erst nach 10 Tagen detektiert. Das hauptsächlich in späten Osteoprogenitoren exprimierte BSP konnte ab Tag 20 nachgewiesen werden. Die schwächere frühe Expression des BSP kann mit einem transienten Auftreten von BSP in frühen Knochenvorläuferzellen begründet werden. Ebenfalls erst nach 20 Tagen war Osteocalcin auf Transkriptebene nachweisbar. Vergleicht man die Daten der RT-PCR mit den Ergebnissen des Osteocalcin-ELISAs ist zu folgern, dass die frühen Messwerte vor Tag 10 als Basislinie des Proteinnachweises gewertet werden müssen. Darüber hinaus konnte mit der semi-quantitativen Methode der RT-PCR keine deutliche Erhöhung der Osteocalcinexpression zwischen Tag 20 und 30 verzeichnet werden. Die Intensität der Bande an Tag 20 gibt Anlass zu der Vermutung, dass eine weitere Erhöhung der Osteocalcin-spezifischen cDNA zu keiner sichtbaren Steigerung des amplifizierten Produktes führte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die prozessbegleitende Analytik deutlich gezeigt wurde, dass die Zellen bei dem gewählten Kultivierungsverfahren auf Camceram-Trägergerüsten nicht nur proliferieren und über einen Zeitraum von 30 Tagen mit hoher Vitalität kultiviert werden können, sondern dass auch ein zielgerichteter medieninduzierter Differenzierungsprozess eingeleitet werden konnte.

## 4. ALLGEMEINE DISKUSSION

### ***4.1 Isolierung und Charakterisierung von Knochenvorläuferzellen der Ratte***

Derzeit existieren zwei weit verbreitete Methoden zur Gewinnung von osteogenen Vorläuferzellen hoher proliferativer Aktivität aus Ratten. Im einen Fall werden Zellen durch enzymatischen Verdau aus den Calvarien von 21 Tage alten Rattenföten (Owen et al., 1990, Sudo et al., 1984, Zohar et al., 1997, Ghilzon et al., 1999) oder neugeborener Ratten (Bellows et al., 1987; Ishaug-Riley et al., 1998) isoliert. Im anderen Fall werden Zellen aus dem Knochenmark der Langknochen (Femur und/oder Tibia) von Jungtieren gewonnen (Maniatopoulos et al., 1988, Herbertson & Aubin, 1997).

Aufgrund der klinischen Zielsetzung der autologen Reimplantation der Zellen bei adulten Patienten scheint die Isolierung aus nicht embryonalem Knochenmark sinnvoller. Allgemein ist aber zu bemerken, dass die mit den genannten Verfahren isolierten Zellen einander in vielen Punkten gleichen. Sie durchlaufen die von Owen et al. 1990 beschriebene Sequenz aus Proliferation und dazu reziprok gekoppelter Differenzierung. Während der Matrixreifung werden die Osteoblastenmarker Alkalische Phosphatase, Osteonectin, Osteopontin, Bone Sialoprotein und Osteocalcin expremiert. Ebenso sind mit beiden Isolierungsmethoden gewonnene Zellen in der Lage zu reifen, mineralisierenden Osteoblasten auszudifferenzieren (Zohar et al. 1997, Herbertson & Aubin, 1997).

Sowohl das verwendete Isolierungsverfahren aus dem Knochenmark der Langknochen von Ratten als auch die Methode der differentiellen Adhäsion und die Subkultivierung ist detailliert beschrieben (Maniatopoulos et al., 1988, Dennis et al., 1992, Kadiyala et al., 1997). Während die genannten Autoren mit Zellen der ersten oder zweiten Passage arbeiteten, wurden die Untersuchungen zur Proliferation und Differenzierung in der vorliegenden Arbeit, wenn nicht anders erwähnt, mit Zellen der vierten Passage durchgeführt. Dies hat mehrere Vorteile: Ausgehend von derselben Anzahl CFU-Fs kann eine deutlich größere Zahl von Knochenvorläuferzellen gebildet werden. Während der verlängerten Kulturphase kann eine Kryokonservierung der Zellen in der 2. Passage erfolgen. Auf diese Weise kann zunächst in einer

Voruntersuchung mit einem Teil der Zellen festgestellt werden, ob die Zellen das für Knochenvorläuferzellen typische Verhalten *in vitro* aufweisen, bevor mit den restlichen Zellen die zur vollständigen Charakterisierung notwendigen Langzeituntersuchungen gestartet werden. Denkbar wäre ebenso das Poolen mehrerer kryokonservierter Isolate nach dem Auftauen, um die benötigten Zellzahlen zu erreichen, wenn diese in den Vorversuchen ein vergleichbares Verhalten zeigen. Durch die Untersuchung der proliferativen Aktivität von fünf verschiedenen Isolaten zeigte sich, dass das mitogene Potenzial bis zur vierten Passage erhalten bleibt, wenn die Zellen kontinuierlich subkonfluent passagiert werden. Die Reinheit der isolierten Zellen erwies sich zudem in der höheren Passage als erheblich besser verglichen mit der ersten oder zweiten Subpopulation. Die Morphologie der erhaltenen Kolonien, sowie der histologische Nachweis der AP-Aktivität nach 14 Tagen und die von Kossa-Färbung auf mineralisierte Nodules nach 21 Tagen war in zeitlich guter Übereinstimmung mit den Literaturdaten (Kadiyala et al., 1997).

Die Ausplattierdichte war mit den nach Voruntersuchungen gewählten  $5 \cdot 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup> nur etwa halb so hoch, wie von anderen Autoren (Owen et al., 1990, Kadiyala et al., 1997) für die Kultur von osteogenen Rattenzellen beschrieben. Bruder et al. zeigten 1997 allerdings, dass die besten Expansionsraten für Humanzellen mit einer Ausplattierdichte von  $5 \cdot 10^3$  Zellen pro cm<sup>2</sup> erreicht werden konnten. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Verdopplungszeiten von 45-50 Stunden in der vierten Passage sind dabei gut vergleichbar mit den von anderen Autoren angegebenen Zellzahlvermehrungen subkonfluenter osteogener Zellen aus Knochenmark der Calvarien und Langknochen (Owen et al., 1990; Maniopoulos, 1988). Die Verdopplungszeiten humaner osteogener Knochenmarkszellen liegen hingegen selbst im Idealfall mit ca. 60-70 Stunden deutlich höher (Bruder et al., 1997).

Die Abweichungen verschiedener Literaturdaten hinsichtlich der Geschwindigkeit der Differenzierung sind bei der biochemischen und molekularbiologischen Charakterisierung von primären Zellen der Ratte erheblich. Dies ist einerseits auf unterschiedliche Isolierungsmethoden und uneinheitliche Differenzierungs- und Proliferationstests zurückzuführen. Andererseits zeigen Primärkulturen naturgemäß größere Schwankungen zwischen einzelnen Isolaten.

Hinsichtlich der Proliferation lässt sich sagen, dass die Zellen mit guter Reproduzierbarkeit etwa 5-7 Tage nach Erreichen der Konfluenz in Flaschenkultur die Proliferation einstellten und dementsprechend auch die Gesamtproteinkonzentration ein Plateau erreichte. Diese Daten waren gut mit den von Owen et al. 1990 publizierten Ergebnissen vergleichbar. Von einer deutlich stärker ausgeprägten Kontakthemmung der Proliferation berichteten allerdings Peter et al., die bereits 24 Stunden nach Erreichen der Konfluenz keine weitere Proliferation beobachteten (Peter et al., 1998). Generell war zu beobachten, dass das superkonfluente Wachstum zunächst auf Kosten der Zellgröße fortschritt. Erst am Ende der proliferativen Phase war an manchen Stellen der Kultur ein mehrschichtiges Zellwachstum (beginnende Nodule-Bildung) zu beobachten.

Bei dem frühen Differenzierungsmarker AP war hinsichtlich des Expressionsmusters eine weitgehende Übereinstimmung der Literaturdaten für mesenchymale Stammzellen der Ratte zu erkennen. Auf mRNA-Ebene war eine frühe transiente Expression der AP zu beobachten, während sich das Enzym selbst, wenn auch mit verminderter Aktivität, auf Proteinebene noch in der Mineralisierungsphase nachweisen ließ (Owen et al., 1990, Peter et al., 1998, Aubin, 1999). Bei der grundlegenden Charakterisierung der Zellen (Abb. 3.7) wurde ein kontinuierlicher Anstieg der proteinspezifischen Aktivität der Alkalischen Phosphatase bis Tag 12 festgestellt. Nach Durchlaufen dieses Maximums fiel die AP-Aktivität bis Tag 35 wieder leicht ab, hatte aber am Ende der Kinetik noch immer einen um den Faktor 3 höheren Wert als zu Beginn.

Ähnliches gilt für das frühe Markergen Kollagen-I. Seine Expression war auf RNA-Ebene bereits zu Beginn der Matrixreifung nicht mehr oder nur noch schwach nachweisbar. Durch Immunhistologie, biochemische Färbung oder ELISA war diese Grundsubstanz der organischen Knochen-ECM noch bis in die Mineralisierungsphase hinein nachweisbar, auch wenn in guter Übereinstimmung mit der fehlenden Expression etwa ab Tag 14 keine weitere Zunahme stattfand (Owen et al., 1990). Stärker als die nicht-kollagenösen Matrixproteine scheint Kollagen-I als vorherrschendes Protein der organischen Matrix seine Bildung selbst in einer Art Produkthemmung zu steuern. Die Transkription von Kollagen-I konnte bei der grundlegenden Charakterisierung durch RT-PCR bis Tag 21 nachgewiesen werden, wobei bereits nach Tag 7 eine deutlich schwächere Transkription als zu Beginn zu beobachten war.

Die anderen durch RT-PCR gewonnenen Daten in Kombination mit dem fluoreszenzphotometrischen Nachweis von Calcium zeigten eindeutig, dass Zellen der vierten Passage alle gängigen Charakteristika der osteogenen Differenzierung aufweisen. Bedingt durch die Mischung verschiedener Differenzierungsstadien in der Kultur sind die Übergänge zwischen den Differenzierungsphasen Matrixbildung, Matrixreifung und Matrixmineralisierung sehr fließend. Es zeigte sich aber doch, dass grundsätzlich eine gerichtete Entwicklung der gesamten Kultur hin zum terminal differenzierten Osteoblasten stattfand. Durch den nach Tag 11 einsetzenden Mineralisierungsprozess wurde die Erreichbarkeit der terminalen Differenzierungsstufe während der Kultur unter Beweis gestellt.

*Tabelle 4.1:* Zeitlicher Vergleich ausgewählter Literaturdaten für die Kulturparameter Proliferation und Mineralisierung bei der Kultivierung von Knochenvorläuferzellen der Ratte. AGD = L-Ascorbat,  $\beta$ -Glycerophosphat, Dexamethason; AG = L-Ascorbat,  $\beta$ -Glycerophosphat.

Autor	Knochenmark- quelle	getestete Passage Kulturmedium	Proliferation [Tage nach Konfluenz]	Beginn Mineral. [Tage nach Konfluenz]
Malaval et al., 1994	Femur	2. Passage MEM alpha, 15% FBS, AGD	4-7	5-7
Owen et al., 1990	fötale Calvarien	Primärkultur MEM, 10% FBS, AG	3-5	7
Peter et al., 1998	Femur	Primärkultur DMEM, 10% FBS, AGD	1	14
Kadiyala et al., 1997	Femur	1. Passage DMEM, 10% FBS, AGD	5-7	14

Als entscheidend ist hierbei die Vergleichbarkeit der Differenzierung hinsichtlich der zeitlichen Abfolge des Auftretens von Differenzierungsparametern anzusehen. Eine exakte Übereinstimmung mit Literaturdaten hinsichtlich des genauen Zeitpunktes beispielsweise der Mineralisierung war nicht zu erwarten. Wie Tabelle 4.1 zeigt, waren die Abweichungen je nach Kultivierungsmethode, eingesetztem Medium, Zellquelle und verwendetem Nachweisverfahren z.T. erheblich. Eine grundlegende Charakterisierung der isolierten Zellen war daher wichtig, um einen Standard zu schaffen, mit dem die weiteren Ergebnisse verglichen werden konnten. Es zeigte sich im Vergleich mit den Literaturdaten, dass die Subkultivierung der Zellen bis zur 4. Passage ihr Differenzierungsverhalten nicht so drastisch veränderte, dass ein Einsatz früherer Passagen von Vorteil gewesen wäre. Es war darüber hinaus zu

bemerken, dass die Differenzierung von Zellen der vierten Passage nicht früher einsetzte als bei Zellen einer Primärkultur oder der ersten Passage. Es ist daher nicht davon auszugehen, dass der Großteil der Zellen während der Subkultivierung bereits zu differenzieren beginnt. Hier bestätigte sich das Konzept der reziproken Kopplung von Proliferation und Differenzierung von Owen et al. (1990). Mit einsetzender Differenzierung nimmt das mitogene Potenzial der Zellen merklich ab.

Trotz der Abweichungen zwischen den Isolaten hinsichtlich der isolierbaren Zellzahl, konnten nach den erhaltenen Ergebnissen mit der verwendeten Isolierungsmethode mit guter Reproduzierbarkeit und hoher Reinheit Zellen isoliert werden, die teilungsfähig waren und der frühen osteogenen Differenzierungslinie angehörten.

#### **4.2 Steuerbarkeit von Zellproliferation und -differenzierung durch das Kulturmedium**

Ein Vorteil der mesenchymalen Stammzellen gegenüber Nerven-, Leber- und Blutstammzellen ist, dass ihre Teilungsfähigkeit *in vitro* verhältnismäßig lange erhalten bleibt (Bruder et al., 1997). Dies gilt sowohl für Humanzellen als auch für Rattenzellen (Bruder et al., 1994). Eine Grundvoraussetzung für die intensive Vermehrung von frühen Osteoblastenvorläufern ist die Vermeidung von ausgeprägtem Zell-Zell-Kontakt, was durch subkonfluentes Passagieren erreicht wird. Alleine durch die Optimierung der Kulturführung konnten Bruder et al. humane osteogene Vorläuferzellen über 15 Passagen vermehren. Dies entspricht im Durchschnitt 38 Populationsverdopplungen.

Das Potenzial, über das Kulturmedium Einfluss zu nehmen, wurde dagegen noch nicht voll ausgeschöpft. Die meisten Arbeitsgruppen verwenden standardmäßig MEM alpha oder DMEM mit den osteogenen Supplementen L-Ascorbat,  $\beta$ -Glycerophosphat, Dexamethason und/oder  $1\alpha$ , 25-Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> sowie 10-15% FBS (s. Tabelle 4.1). Obwohl es ausreichend Daten zum mitogenen Einfluss von Cytokinen wie PDGF-BB, bFGF oder EGF auf osteogene Zellen gibt (Pri-Chen et al., 1998; Sandy et al., 1998; Owen et al., 1987), existieren nur eine verhältnismäßig kleine Anzahl von Publikationen, die sich mit einem Ersatz des Serums durch diese Cytokine beschäftigen (Angele et al., 1999; Reyes et al., 2001). Im Gegensatz zu beispielsweise hämatopoetischen Stammzellen sind auch kommerziell keine serumfreien Medien für die Kultur von mesenchymalen Stammzellen erhältlich. Dabei



stellt ein definiertes Medium, dem im Laufe der Kultur Faktoren zugefügt oder entnommen werden, eine sehr gute Möglichkeit zur Steuerung von Zellproliferation und -differenzierung dar. Darüber hinaus vereinfacht die Reduzierung des Gesamtproteingehalts und der Proteinkomponenten im Medium die sensible Medienanalytik beispielsweise mit ELISAs erheblich.

Die Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Cytokinen auf der Ebene der Rezeptoren und der Signalwege an der Membran, im Cytoplasma und am Zellkern sind in ihrem ganzen Umfang noch nicht verstanden. Einerseits gibt es nur eine begrenzte Anzahl von intrazellulären Signalwegen, andererseits eine große Anzahl von löslichen und nicht-löslichen Rezeptoren für Mitogene, die die intrazelluläre Signaltransduktion stimulieren (Schwartz & Baron, 1999). Die Suche nach einer geeigneten Cytokinkombination kann daher zur Zeit nur durch eine Vorauswahl von Mitogenen und ein umfangreiches Screening erfolgen. Durch die Etablierung eines Proliferationstests auf Basis des kommerziell erhältlichen Vitalitätstests WST-1 konnte ein effektives Screening einer Anzahl von aussichtsreichen Cytokinen hinsichtlich ihrer mitogenen Wirksamkeit auf primäre Knochenvorläuferzellen der Ratte durchgeführt werden. Durch die photometrische Auswertung der Ergebnisse und die Kulturführung auf 96-Well-Platten konnten eine große Anzahl von Cytokinkombinationen mit statistischer Sicherheit überprüft werden. Dabei ergab sich, dass die potentesten Mitogene PDGF-BB, bFGF und Insulin sind. Der Synergismus aus diesen drei Cytokinen kann durch die Addition von weiteren Cytokinen wie IGF-I und EGF, die ebenfalls für ihre mitogene Wirkung bei Knochenvorläuferzellen bekannt sind (Mundy et al., 2001) nicht weiter gesteigert werden. Durch die eingesetzten Cytokine PDGF-BB, bFGF und Insulin werden drei unabhängige Rezeptorgruppen der Knochenvorläuferzellen aktiviert, deren mitogene Wirksamkeit bekannt ist (Wang et al., 1994; Centrella et al., 1992; Dequeker et al., 1993).

Der Versuch das stark serumhaltige Medium durch eine serumfreie Alternative zu ersetzen war nicht erfolgreich. Der Serumanteil im Medium konnte jedoch von 15% auf 1% reduziert werden. Das Serum beeinflusst neben der Proliferation auch die Adhärenz und vor allem das Ausspreiten des Cytoskeletts nach der primären Adhäsion der Zellen.

Für die Kultivierung der humanen Osteosarkomzelllinie Saos-2 wurde ein Kultivierungsansatz beschrieben, der den besonderen Einfluss des Serums bei der

Adhärenz berücksichtigt: Die Zellen wurden in Medium mit 10% FBS ausgesät, welches 24 Stunden später durch serumfreies DMEM mit osteogenen Supplementen ersetzt wurde (Anh et al., 1998). Angele et al. (1999) vermehrten primäre Vorläuferzellen der chondrogenen Linie zunächst auf Petrischalen mit serumhaltigem Medium (DMEM-LG, 10% FBS). Die Besiedlung von Trägern aus Hyaluronsäure und Gelatine (70/30) erfolgte allerdings in serumfreiem DMEM-HG, das mit Insulin, Transferrin, BSA, Pyruvat, Selensäure und Linolsäure versetzt wurde. Eine verminderte Adhärenz der chondrogenen Vorläuferzellen wurde nicht erwähnt. Durch die fehlenden mitogenen Faktoren wurde keine Vermehrung der Zellen auf den Trägern mehr beobachtet, die Zellen blieben allerdings über einen Zeitraum von 28 Tagen vital.

Eine erfolgreiche Vermehrung von humanen mesenchymalen Stammzellen mit einem ebenfalls serumreduzierten Medium (DMEM-LG/MDCB-201, 2% FBS), dessen mitogene Komponenten bFGF, Insulin, PDGF-BB und EGF sind, beschrieben Reyes et al. (2001). Hierbei wurden Verdopplungszeiten von 48-72 Stunden erreicht und eine Expansion mit bis zu 60 Verdopplungen.

In der vorliegenden Arbeit wurde in Anlehnung an das von Owen et al. 1990 publizierte Modell der reziproken Kopplung von Proliferation und Differenzierung das Proliferationsmedium in Verlauf der Kulturführung durch ein Differenzierungsmedium ersetzt. Das Proliferationsmedium enthält im Gegensatz zum Differenzierungsmedium die beiden mitogenen Cytokine bFGF und PDGF-BB. Die osteogenen Supplemente L-Ascorbat-2-Phosphat,  $\beta$ -Glycerophosphat und Dexamethason können dagegen in der Proliferationsphase nicht aus dem Medium entfernt werden, da sich die Differenzierbarkeit dadurch deutlich verschlechtern würde.

Mit dem entwickelten serumreduzierten Medium und dem Konzept der Entfernung der mitogenen Cytokine während der Differenzierung ist eine optimale Kulturführung von primären osteogenen Zellen der Ratte sowohl während der Expansion als auch während der Differenzierung möglich. Die Reduzierung des Serumanteils auf 1% ermöglicht den Einsatz störanfälliger Meßsystemen wie den Osteocalcin-ELISA. Dies erweitert vor allem die Möglichkeiten der Prozessüberwachung im Bioreaktorversuch, da das Kulturmedium für alle Tests einsetzbar war. Die mit Zellen humanen Ursprungs durchgeführten Experimente weisen darauf hin, dass eine ähnliche proliferative Wirksamkeit des Mediums auch auf humane Knochenvorläuferzellen zu erwarten ist. Diese Erwartung wird durch die von Reyes et al. 2001 publizierten

Daten über die serumreduzierte Kultivierung von Humanzellen mit einer vergleichbaren Cytokinkombination gestützt.

### **4.3 Kultivierung von Zellen auf Trägergerüsten**

#### **4.3.1 Auswahl und Besiedlung des Trägergerüstes**

Die Kultivierung von Zellen auf Trägergerüsten stellt sowohl hinsichtlich der Kulturführung als auch hinsichtlich der begleitenden Analytik erhöhte Anforderungen. Des Weiteren ist die Auswahl der Trägergerüste von entscheidender Bedeutung. Die drei eingesetzten Trägergerüste zeigten deutliche Unterschiede in ihrer Verwendbarkeit für die Langzeitkultur von osteogenen Primärzellen *in vitro*. Während Vitoss deutlich Defizite bereits in der Expansionsphase zeigte, konnte sich Camceram gegenüber dem PLGA-Material Osteofoam durch leichte Vorteile in der Langzeitkultur auszeichnen. Trägergerüste auf Calciumphosphatbasis sind zwar deutlich brüchiger als Polymergerüste, sind aber auch in der Lage, die dreidimensionale Gerüststruktur in der Langzeitkultur deutlich besser aufrecht zu erhalten (Holy et al., 1999). Während die Polymere *in vivo* dagegen für die Gefahr der Acidifizierung des Gewebes durch die Monomere bekannt ist, bietet es andererseits chemisch weit mehr Möglichkeiten zur gezielten Modifikation als die Calciumphosphate. Die Herstellung eines Polymer-Calciumphosphat-Komposites soll die Vorteile beider Materialien vereinigen und die Nachteile minimieren. So soll das Kompositmaterial z.B. die Formstabilität des Calciumphosphates mit der größeren Elastizität des Polymers vereinigen. Dies soll durch eine Beschichtung von PLGA-Gerüsten mit einer Calciumphosphatschicht erreicht werden. Obwohl die eingesetzten Trägergerüste Osteofoam und Camceram durch die Interkonnektivität und die hohe Porosität bereits gute Ergebnisse liefern, ist die Suche nach einem optimalen Trägergerüst noch nicht abgeschlossen.

Die Grundlage der Kultivierung stellt die Besiedlung der Trägergerüste dar. Das im Laufe der vorliegenden Arbeit entwickelte Besiedlungsverfahren erhöht den Anteil der adhärierten Zellen auf über 80%. Dies ist im Vergleich zu den vorher bekannten Verfahren eine Steigerung zwischen von 10-40% (Shea et al., 2000; Ishaug-Riley et al., 1998). Durch die Kapillareffekte des Trägermaterials wird dabei eine weitgehend einheitliche Besiedlung des Trägergerüstes erreicht. Obwohl durch die Interkonnektivität der Poren eine Migration der Zellen im Trägermaterial denkbar ist,

stellt die einheitliche Besiedlung des Trägers die optimale Ausgangslage für ein Durchwachsen des gesamten Gerüsts dar.

Außerdem kann durch das eingesetzte Verfahren auf ein Beschichtungsmaterial wie Kollagen oder Fibrin verzichtet werden. Dies ist von Vorteil, da so die Gefahr einer Blockierung von Poren durch ECM-Material minimiert wird und die Interkonnektivität der Poren erhalten bleibt.

#### **4.3.2 Vergleich von Bioreaktor- und statischer Kultur**

Bei der Kultivierung von osteogenen Zellen in größeren Trägergerüsten erweist sich immer wieder ein Faktor als limitierend: Die fehlende Durchdringungstiefe des Mediums verursacht eine unzureichende Versorgung der Zellen im Innern des Trägergerüsts. Zellen bis zu einer Tiefe von 300 µm werden noch ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt. Dies ist auch *in vivo* die maximale Entfernung von einer Blutkapillare in der ein Osteoblast überleben kann.

Sowohl in statischer Kultur (Ishaug-Riley et al., 1998) als auch in bewegter Kultur, die durch Kultivierung von Trägergerüsten in Rollerflaschen (Goldstein et al., 1999) oder Spinnerkulturen (Shea et al., 2000) realisiert wurde, besteht das Problem, dass die Zellen vornehmlich an der Trägergerüstoberfläche etwa bis zu einer Tiefe von 200-300 µm wachsen, das Trägergerüstinnere aber weitgehend zellfrei bleibt. Der grundlegende Vorteil der Perfusionskultur im Bioreaktor besteht darin, dass mittels der erzwungenen Durchströmung die Zellen in allen Bereichen des porösen Trägergerüsts gleichermaßen mit Medium versorgt werden. Durch die kontinuierliche Perfusion sollen so die Zellen einerseits mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt und andererseits toxische Stoffwechselprodukte wie Lactat und Ammonium kontinuierlich entfernt werden. Während ein toxischer Effekt durch lokale Überschreitungen der Lactat-Konzentrationen nach den erhaltenen Daten durchaus denkbar ist, spielt Ammonium als toxisches Nebenprodukt keine Rolle.

Vergleicht man die Daten der statischen Langzeitkultur auf Camceram (Abb. 3.21 u. 3.22) mit den Daten der Langzeitkultur im Bioreaktor mit demselben Trägermaterial (Abb. 3.32–3.34) direkt miteinander, so zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen beiden Prozessen.

Während die Zellen im statischen Ansatz im Verlauf der gesamten 30tägigen Kultur proliferieren, haben die Zellen in der Bioreaktorkultur bereits an Tag 10 ihre

maximale Zelldichte erreicht. Dabei liegt der an Tag 10 im Bioreaktor erreichte Plateauwert von etwa  $4 \cdot 10^7$  Zellen pro Träger etwa um den Faktor 1,6 höher als die an Tag 30 in der statischen Kultur erreichte Zelldichte. Die Lactatbildungsrate als metabolischer Parameter unterstützt diese Beobachtung: Im Bioreaktor erreichte sie nach 8 Tagen ein Plateau, während in der statischen Kultur bis Tag 24 ein kontinuierlicher Anstieg zu beobachten war. Ein direkter Vergleich der absoluten Werte muss hier unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Arten des Medienwechsels erfolgen: Durch den kontinuierlichen Medienaustausch im Bioreaktor von 10 ml pro Tag bei einem Reaktorvolumen von 30 ml ist der ermittelte Lactatwert gegenüber dem Wert aus der statischen Kultur etwa um ein Drittel reduziert. Der erreichte Plateauwert von ca. 0,18 mg/ml·Tag würde in einer Kultur mit diskontinuierlichem Mediumwechsel also etwa bei 0,24 mg/ml·Tag liegen. Dieser Wert ist vergleichbar mit der an Tag 30 in statische Kultur erreichten Lactatbildungsrate von 0,22 mg/ml·Tag. Die zellspezifische Lactatbildung war demnach in der statischen Kultur deutlich höher als im Bioreaktor. Komarova et al. (2000) haben gezeigt, dass sich die glykolytische Aktivität bei differenzierenden Knochenvorläuferzellen der Ratte zugunsten der Atmung verringert. Je Differenzierungsstatus sollte der stündliche Verbrauch bei einer maximalen Zelldichte von  $4 \cdot 10^7$  Zellen pro Träger zwischen 160 und 680 nmol liegen. Unter den gewählten Kulturbedingungen mit 20% Luftsättigung und einer Perfusion des Gerüsts mit 200 µl/min werden ca. 525 nmol gelöster Sauerstoff pro Stunde durch das Trägergerüst gepumpt. Eine mögliche Sauerstoff-Limitierung der Zellen könnte durch das Verhältnis der geringe Umwälzrate von 200 µl/min zu dem Kulturvolumen von 30 ml mithilfe der Sauerstoffsonde nicht detektiert werden. Bei den Untersuchungen zum Einfluss des Sauerstoffgehaltes auf die Proliferation der Zellen wurden nur wenig geringere Zelldichten (Abb. 3.30b) erreicht. Hier konnte auch mit dem geringen Sauerstoffgehalt von 20% Luftsättigung keine Limitierung beobachtet werden. Da der Sauerstoffverbrauch der Zellen allerdings mit fortschreitender Differenzierung zunimmt und sich ein höherer Sauerstoffgehalt nicht nachteilig auf die Kultur auswirkt, sollte bei den weiteren Bioreaktorkulturen mit einem höheren Sauerstoffgehalt begast werden.

In der Bioreaktorkultur war zudem eine deutliche Diskrepanz zwischen der bestimmten Zellzahl und der ermittelten Lactatbildungsrate zu verzeichnen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die fluoreszenzphotometrisch bestimmte DNA zu

einem erheblichen Anteil von toten Zellen stammt. Vergleicht man aber den LDH-Wert im Bioreaktor mit dem LDH-Wert in der statischen Kultur, wiederum unter Berücksichtigung des kontinuierlichen Medienwechsels im Bioreaktor, so stellt man fest, dass die LDH-Freisetzungsrate im Bioreaktor nur etwa ein Drittel der LDH-Freisetzungsrate in der statischen Kultur ausmacht, was ein erhöhtes Absterben der Zellen unwahrscheinlich macht. Gegen diesen Erklärungsansatz spricht des Weiteren, dass durch die Perfusion des Trägergerüsts die nicht mehr adhären, abgestorbenen Zellen eigentlich aus dem Trägergerüst ausgespült werden müssten und so bei der DNA-Bestimmung nicht berücksichtigt würden.

Betrachtet man dagegen im Vergleich die Differenzierung in beiden Ansätzen, zeigt sich, dass die Differenzierung in der Bioreaktorkultur deutlich früher begann als in der statischen Kultur. Im Bioreaktor erreichte die AP-Aktivität nach 12 Tagen eine Plateauphase, während in der statischen Kultur erst nach 15 Tagen ein verstärkter Anstieg der AP-Aktivität zu beobachten war. Die in der statischen Kultur bestimmte Osteocalcinkonzentration lag im unteren Messbereich des verwendeten ELISAs. Ein erkennbarer Anstieg der Werte ist erst nach Tag 22 zu beobachten. Im Bioreaktor dagegen begann der Anstieg der Osteocalcinkonzentration bereits nach Tag 15. Bis Tag 30 war eine Erhöhung der Konzentration um den Faktor fünf festzustellen. Zellen, die das proliferative Stadium bereits wieder verlassen haben, können ebenfalls durch geringere metabolische Aktivität zur Verringerung der Lactatbildung und des Sauerstoffverbrauchs beitragen.

Zusammenfassend kann man daher sagen, dass im Bioreaktor eine kurze Proliferationsphase, die etwa nach sieben Tagen beendet war, von einer knochenspezifischen Differenzierung gefolgt wurde. In der statischen Kultur dagegen ist die Proliferationsphase deutlich verlängert. Dementsprechend beginnt die Differenzierung erst nach 15 Tagen und verläuft insgesamt deutlich langsamer. Als mögliche Ursache für die beschleunigte Proliferation im Bioreaktor kann die verbesserte Versorgung der Zellen mit Medium durch die erzwungene Durchströmung genannt werden. Die verbesserte Proliferation wiederum bildet die Grundlage für eine schnellere Differenzierung der Zellen. Darüber hinaus könnte die Perfusion des Trägergerüsts als leichte mechanische Stimulierung anregend auf die Differenzierung der Zellen wirken. Es ist bekannt, dass ein geringer physiologischer Druck positiv auf Proliferation und Differenzierung von Knochenvorläuferzellen wirkt (Meyer et al., 2001). Obwohl durch die Durchströmung weniger Druck- als vielmehr

Scherkräfte auf die Zellen ausgeübt werden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass bedingt durch die uneinheitliche Porengeometrie ein lokaler Druck auf die Zellen ausgeübt wird.

#### **4.4 Zusammenfassung und Ausblick**

Die Herstellbarkeit funktionaler Implantate für große Knochendefekte mit Methoden des Tissue Engineering hängt grundlegend von der Kulturführung *in vitro* ab. Dabei ist ein System anzustreben, dass sowohl die kontrollierte Proliferation und Differenzierung der Zellen als auch die Analyse des Prozesses ohne Beeinflussung des zu implantierenden Konstruktes erlaubt. Entscheidend für einen erfolgreichen Einsatz *in vivo* ist die reproduzierbare Herstellung eines vollständig besiedelten und vitalen Implantats *in vitro*.

In der vorliegenden Arbeit wurde am Beispiel von primären osteogenen Zellen der Ratte ein Kultivierungsmodell entwickelt, dass die Herstellung von implantierbaren Konstrukten, bestehend aus einheitlich mit osteogenen Zellen besiedelten Trägergerüsten mit knochenspezifischer ECM, ermöglicht.

Anhand der Charakterisierung der isolierten Zellen sowie der Untersuchungen zu deren Kryokonservierung und Subkultivierung konnte eine reproduzierbare Methode zur Gewinnung einer ausreichenden Zahl proliferationsfähiger Vorläuferzellen etabliert werden. Die detaillierte Analyse der Zelldifferenzierung in Flaschenkultur ermöglichte zudem eine Abschätzung optimaler Sollwerte bei wichtigen Parametern wie Besiedlungsdichte, Medienaustauschrate und Kulturdauer für die dreidimensionale Kultivierung auf Trägergerüsten.

Durch die Untersuchung der Einflüsse von Cytokinen auf Proliferation und Differenzierung konnte die Kombination aus PDGF-BB und bFGF als besonders effektiv für die Proliferation der Zellen identifiziert werden. Infolgedessen konnte eine Reduzierung des Serumanteils von 15 auf 1% für die gesamte Kulturdauer erreicht werden. Die Entfernung der mitogenen Cytokine nach der Proliferationsphase führte zudem zu einer beschleunigten Differenzierung der Zellen. Diese Erkenntnis ermöglichte eine Steuerung des Differenzierungsstatus über Medienkomponenten: Durch Entfernung der mitogenen Cytokine aus dem Kulturmedium konnte die Differenzierung der Zellen gegenüber der Proliferation begünstigt werden.

Das entwickelte Medium bildet eine gute Basis, um die Einflussnahme über Cytokine und andere Mediensupplemente auch für die Kultur von humanen Zellen weiter zu

verfeinern. Potente osteogene Faktoren wie Vitamin D3 oder auch die Mitglieder der BMP-Familie stellen hier aussichtsreiche exogene Kandidaten für die weitere Verbesserung der gesteuerten Differenzierung dar.

Der Einsatz der Bioreaktoren, deren weiterentwickelte Konfiguration eine erzwungene Durchströmung des Trägergerüsts sowie einen kontinuierlichen Medienaustausch über die gesamte Kulturperiode von 30 Tagen hinweg erlaubt, zeigte deutliche Vorteile gegenüber der statischen Kulturführung. Diese zeigten sich nicht nur durch die erhöhten Zelldichten, sondern damit einhergehend auch durch die beschleunigte Differenzierung der Zellen auf dem Trägergerüst. Die prozessbegleitende Analytik ermöglicht, auch aufgrund des serumreduzierten Mediums und der Reduzierung des Reaktorvolumens von 80 auf 30 ml, eine detaillierte Überwachung der Proliferation und Differenzierung der Zellen, ohne die dreidimensionale Integrität des Gewebes im Trägergerüst zu beeinträchtigen. Eine weitere Verbesserung der Prozessüberwachung könnte durch eine Erweiterung der im Medium nachgewiesenen Proliferations- und Differenzierungsparameter erreicht werden. Allerdings trägt auch der wiederholte Einsatz der Bioreaktoren und der damit verbundene Abgleich von Daten, die einerseits aus der Analytik der Zellen im Träger und andererseits nicht-invasiv aus der Analyse des Kulturüberstands gewonnen werden, zu einer verbesserten Interpretation der nicht-invasiv erhaltenen Daten bei.

Die Optimierung und Automatisierung der Kulturführung und der begleitenden Analytik, wie sie in der vorliegenden Arbeit vorgestellt wurden, sind entscheidende Schritte zur Sicherstellung eines verlässlichen Herstellungsverfahrens von Knochengewebeersatz. Die entgeltliche Evaluierung des hergestellten Implantates muss allerdings *in vivo* erfolgen. Basierend auf den geleisteten Arbeiten werden daher Versuche zur Heilung eines Defektes kritischer Größe im Tiermodell angeschlossen.



## 5. LITERATURVERZEICHNIS

Angele, P., Kujat, R., Nerlich, M., Yoo, J., Goldberg, V., Johnstone, B.: *Engineering of osteochondral tissue with bone marrow mesenchymal progenitor cells in a derivatized hyaluronan-gelatin composite sponge*. Tissue Eng. **5**(6), 545-554, 1999.

Anh, D.J., Dimai, H.P., Hall, S.L., Farley, J.R.: *Skeletal alkaline phosphatase activity is primarily released from human osteoblasts in an insoluble form, and the net release is inhibited by calcium and skeletal growth factors*. Calcif. Tissue Int. **62**(4), 332-340, 1998.

Antosz, M.E., Bellows, C.G., Aubin, J.E.: *Biphasic effects of epidermal growth factor on bone nodule formation by isolated rat calvaria cells in vitro*. J. Bone Miner. Res. **2**, 385-393, 1987.

Arnold, U., Lindenhayn, K., Perka, C.: *In vitro-cultivation of human periosteum derived cells in bioresorbable polymer-TCP-composites*. Biomaterials **23**(11), 2303-2310, 2002.

Aubin, J.E. & Liu, F.: *The osteoblast lineage*. In Bilezikian, J.P., Raisz, L.G., Rodan, G.A. (eds.): Principles of Bone Biology, Acad. Press, New York, 51-65, 1996.

Aubin, J.E.: *Bone stem cells: new directions and dimensions in cellular biochemistry*. J. Cell. Biochem. **30/31** (suppl.), 73-82, 1998.

Aubin, J.E.: *Osteogenic cell differentiation*. In Davies, J.E. (ed.): Bone engineering, em squ. inc., Toronto, 19-30, 1999.

Bab, I., Howlett, C.R., Ashton, B. A., Owen, M. E.: *Ultrastructure of bone and cartilage formed in vivo in diffusion chambers*. Clin. Orthop. **187**, 243-254, 1984.

Baksh, D. and Davies, J.E.: *Design strategies for 3-Dimensional In Vitro Bone growth in Tissue-Engineering Scaffolds*. In Davies, J.E. (ed.), Bone engineering, em squ. inc., Toronto, 488-495, 1999.

Baron, R.E.: *Anatomy and Ultrastructure of Bone*. In Favus, M.J., Goldring, S.R., Hendy, G.N., Holick, M.F., Kaplan, F., Khosla, S., Kleerekoper, M., Langman, C.B., Lian, J.B., Shane, E., Shoback, D.M., Stewart, A.F., Whyte, M.P., Christakos, S. (eds.): Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, Philadelphia, New York: Lippincott-Raven, 3-10, 1996.

Bellows, C.G., Aubin, J.E., Heersche, J.N.: *Physiological concentrations of glucocorticoids stimulate formation of bone nodules from isolated rat calvaria cells in vitro*. Endocrinology **121**(6), 1985-92, 1987.

Bennett, J.H., Joyner, C.J., Triffitt, J.T., Owen, M.E.: *Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential*. J. Cell Sci. **99** (Pt 1), 131-139, 1991.

Bertram, H.: *Untersuchungen zur Osteogenese von humanen mesenchymalen Stammzellen*. Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, 2002.

Bolander, M.E., Young, M.F., Fisher, L.W., Yamada, Y., Termine, J.D.: *Osteonectin cDNA sequence reveals potential binding regions for calcium and hydroxyapatite and shows homologies with both a basement membrane protein (SPARC) and a serine proteinase inhibitor (ovomucoid)*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 2919-2923, 1988.

Bonfield, W.: *Composites for bone replacement*. J. Biomed. Eng. **10**, 522-526, 1988.

Bostman, O.M., Paivarinta, U., Partio, E., Manninen, M., Vasenius, J., Majola, A., Rokkanen, P.: *The tissue-implant interface during degradation of absorbable polyglycolide fracture fixation screws in the rabbit femur*. Clin Orthop. **285**, 263-72, 1992.

Bruder, S.P., Fink, D.J., Caplan, A.I.: *Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy*. J. Cell. Biochem. **56**(3), 283-94, 1994.

- Bruder, S.P., Kraus, K.H., Goldberg, V.M., Kadiyala, S.: *The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects*. J Bone Joint Surg Am. **80**, 985-96, 1998.
- Bruder, S.P., Jaiswal, N., Haynesworth, S.E.: *Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation*. J Cell Biochem. **64**, 278-94, 1997.
- Buckwalter, J.A., Glimcher, M.J., Cooper, R.R., Recker, R.: *Bone biology part I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization*. J. Bone and Joint Surg. **77-A**(8): 1256-1274, 1996.
- Burgess, W.H. and Marciag, T.: *The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins*. Annu. Rev. Biochem. **58**, 575-606, 1989.
- Butler, W.T.: *Mineralized tissues an overview*. In Methods in Enzymol., Acad. Press, New York, **145**, 255-261, 1987.
- Canalis, E. and Raisz, L.G.: *Effect of Epidermal Growth Factor on bone formation in vitro*. Endocrinology **104**, 862-870, 1979.
- Canalis, E., Centrella, M., McCarthy, T.: *Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation in vitro*. J. Clin. Invest. **81**, 1572-1577, 1988.
- Canalis, E., Pash, J., Varghese, S.: *Skeletal growth factors*. Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. **3**, 155-166, 1993.
- Cancedda, R.: *Cell therapy and tissue engineering for cartilage and bone repair*. Vortrag während der "Second transdisciplinary conference on the principles and perspectives in regenerative medicine", Hannover, 2001.
- Caplan, A.I., Bruder, S. P.: *Cell and molecular engineering of bone regeneration*. In Lanza, R., Langer, R., Chick, W. (eds.): Principles of tissue engineering, Academic Press, New York, 603-618, 1997.
- Caplan, A.I.: *New logic for tissue engineering: Multifunctional and biosmart delivery vehicles*. In Davies, J.E. (ed.): Bone engineering, em squ. inc., Toronto, 441-446, 1999.
- Carter, D.R., Beaupré, G.S., Giori, N.J., Helms, J.A.: *Mechanobiology of Skeletal Regeneration*. Clin. Orthop. Res. **355S**, S41-S55, 1998.
- Centrella, M., McCarthy, T.L., Canalis, E.: *Mitogenesis in fetal rat bone cells simultaneously exposed to type beta transforming growth factor and other growth regulators*. FASEB J. **4**, 312-317, 1987.
- Centrella, M., McCarthy, T.L., Kusmik, W.F., Canalis, E.: *Isoform-specific regulation of platelet-derived growth factor activity and binding in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone*. J. Clin. Invest. **89**, 1076-1084, 1992.
- Chaplin, A.J., Grace, S.R.: *Calcium oxalate and the von Kossa method with reference to the influence of citric acid*. Histochem. J. **7**, 451-458, 1975.
- Chen, T.L., Chang, L.Y., Bates, R.L., Perlman, A.J.: *Dexamethason and 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> modulate the synthesis of insulin-like growth factor-binding proteins in rat osteoblast-like cell cultures*. Endocrinology **128**, 73-80, 1991.
- Chesney, J., Bucala, R.: *Peripheral blood fibrocytes: Mesenchymal precursor cells and the pathogenesis of fibrosis*. Curr. Rheumatol. Rep. **2**(6), 501-505, 2000.
- Chomczynski, P.: *A reagent for the single step isolation of RNA, DNA and proteins from cells and tissue samples*. Biotechniques **15**, 532-537, 1993.
- Conover, C.A.: *The Role of Insulin-like Growth Factors and Binding Proteins in Bone Cell Biology*. In Bilezikian, J.P., Raisz, L.G., Rodan, G.A. (eds.): Principles of Bone Biology, Acad. Press, New York, 607-618, 1996.

Davies, J.E., *Bone engineering*, em squ. inc., Toronto, 1999.

Dennis, J.E., Haynesworth, S.E., Young, R.G., Caplan, A.I.: *Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression*. Cell Transplant. **1**(1), 23-32, 1992.

Dequeker, J., Mohan, S., Finkelman, R.D., Aerssens, J., Baylink, D.J.: *Generalized osteoarthritis associated with increased insulin-like growth factor type I and II and transforming growth factor  $\beta$  in cortical bone from the iliac crest: Possible mechanism of increase bone density and protection against osteoporosis*. Arthritis Rheum. **36**, 1702-1708, 1993.

Domenicucci, C., Goldberg, H.A., Hofmann, T., Isenmann, D., Wasi, S., Sodek, J.: *Characterization of porcine osteonectin extracted from fetal calvariae*. Biochem. J. **253**, 139-151, 1988.

Effah Kaufmann, E.A., Ducheyne, P., Shapiro, I.M.: *Evaluation of osteoblast response to porous bioactive glass (45S5) substrates by RT-PCR analysis*. Tissue Eng. **6**(1), 19-28, 2000.

Elgendy, H.M., Norman, M.E., Keaton, A.R., Laurencin, C.T.: *Osteoblast-like cell (MC3T3-E1) proliferation on bioerodible polymers: an approach towards the development of a bone-bioerodible polymer composite material*. Biomaterials **14**, 263-269, 1993.

Favus, M.J., Goldring, S.R., Hendy, G.N., Holick, M.F., Kaplan, F., Khosla, S., Kleerekoper, M., Langman, C.B., Lian, J.B., Shane, E., Shoback, D.M., Stewart, A.F., Whyte, M.P., Christakos, S. eds.: *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, Lippincott-Raven, Philadelphia New York, 1996.

Francheschi, R. and Young, J.: *Regulation of Alkaline Phosphatase by 1,25 Dihydroxy Vitamin D<sub>3</sub> and ascorbic acid in bone derived cells*. J. Bone Miner. Res. **5**, 1157-1167, 1990.

Friedenstein, A. J., Gorskaja J. F., Kulagina N. N., *Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs*, Exp. Hämatol. **4**, 267-74, 1976.

Fukuda, K.: *Reprogramming of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes*. Crit. Rev. Biol. **325**(10), 1027-1038, 2002.

Ghilzon, R., McCulloch, C.A.G., Zohar, R.: *Stromal mesenchymal progenitor cells*. Leukem. Lymph. **32**, 211-221, 1999.

Giguere, V., Hollenberg, S.M., Rosenfeld, M.G., Evans, R.M.: *Functional domains of the human glucocorticoid receptor*. Cell **46**, 645-52, 1986.

Globus, R.K., Plouet, J., Gospodarowitz, D.: *Cultured bovine bone cells synthesize basic fibroblast growth factor and store it in their extracellular matrix*. Endocrinology **137**, 331-339, 1996.

Goldstein, A.S., Zhu, G., Morris, G.E., Meszlenyi, R.K., Mikos, A.G.: *Effect of osteoblastic culture conditions on the structure of poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foam scaffolds*. Tissue Eng. **5**, 421-434, 1999.

Goshima, J., Goldberg, V.M., Caplan, A.I.: *The origin of bone formed in composite grafts of porous calcium phosphate ceramic loaded with marrow cells*. Clin Orthop. **269**, 274-283, 1991.

Greco R.M., Iacono, J.A., Ehrlich, H.P.: *Hyaluronic Acid stimulates human fibroblast proliferation within a collagen matrix*. J. Cell. Physiol. **177**, 465-473, 1998.

Grigoriadis, A.E., Wang, Z., Wagner, E.F.: *Regulation of bone cell differentiation and bone remodelling by the c-Fos/AP-1 transcription factor*. In Bilezikian, J.P., Raisz, L.G., Rodan, G.A. (eds.): Principles of Bone Biology, Acad. Press, New York, 15-24, 1996.

Grzesik, W.J., Robey, P.G.: *Bone matrix RGD glycoproteins: immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro*. J. Bone Miner. Res. **9**, 487-96, 1994.

- Guller, S., Corin, R.E., Mynarcik, D.C., London, B.M., Sonenberg M.: *Role of insulin in growth hormone-stimulated 3T3 cell adipogenesis*. Endocrinology **122**, 2084-2089, 1988.
- Hale, L.V., Ma Y.F., Santerre, R.F.: *Semi-Quantitative fluorescence analysis of Calcein binding as a measurement of in vitro mineralization*. Calcif. Tissue Int., **67**, 80-84, 2000.
- Haralson, M.A., Hassel, J.R.: *The extracellular matrix – an overview*. In Haralson, M.A., Hassel, J.R. (eds.): *The extracellular Matrix – A Practical Approach*, Oxford University Press, 1-4, 1995.
- Havada, S., Matsimoto, T., Ogata, E.: *Role of ascorbic acid in the regulation of proliferation in MC3T3-E1 cells*. J. Bone Miner. Res. **9**, 903-908, 1991.
- Heinegard, D. and Oldberg, A.: *Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules*. FASEB J. **3**, 2032-2051, 1989.
- Heldin, C.H. and Westermark, B.: *PDGF-like growth factors in autocrine stimulation of growth*. J. Cell Physiol. **5** Suppl., 31-34, 1987.
- Hench, L.L.: *Bioactive materials: the potential for tissue regeneration*. J. Biomed. Mater. Res. **41**(4), 511-518, 1998.
- Herbertson, A. and Aubin, J.E.: *Cell sorting enriches osteogenic populations in Rat Bone Marrow Stromal Cell Cultures*, Bone **21**, 491-500, 1997.
- Hock, J.M. and Canalis, E.: *Platelet derived growth factor enhances bone cell replication, but not differentiated function of osteoblasts*. Endocrinology **134**, 1423-1428, 1994.
- Holmes, R.E., Bucholz, R.W., Mooney, V.: *Porous hydroxyapatite as a bone-graft substitute in metaphyseal defects. A histometric study*. J. Bone Joint Surg. Am. **68**, 904-911, 1986.
- Holy, C.E., Dang, S.M., Davies, J.E, Shoichet, M.S.: *In vitro degradation of a novel poly(lactide-co-glycolide) 75/25 foam*. Biomaterials **20**, 1177-1185, 1999.
- Hott, M., Noel, B., Bernache-Assolant, D., Rey, C., Marie, P.J.: *Proliferation and differentiation of human trabecular osteoblastic cells on hydroxyapatite*. J. Biomed. Mater. Res. **37**, 508-516, 1997.
- Hunziger, E.B.: *Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes*. Microscop. Res. Technol., **28**, 505-519, 1994.
- Hurley, M.M., Abreu, C., Gronowitz, G., Kawaguchi, H., Lorenzo, J.: *Expression and regulation of basic fibroblast growth factor mRNA levels in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells*. J. Biol. Chem. **269**, 9392-9396, 1994.
- Ishaug, S.L., Crane, G.M., Miller, M.J., Yasko, A.W., Yaszemski, M.J., Mikos, A.G.: *Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds*. J. Biomed. Mater. Res. **36** (1), 17-28, 1997.
- Ishaug-Riley, S.L., Crane-Kruger, G.M., Yaszemski, M.J., Mikos, A.G.: *Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers*. Biomater. **19**, 1405-1412, 1998.
- Jäger, V., Lehmann, J., Friedl, P.: *Serum-free growth medium for the cultivation of a wide spectrum of mammalian cells in stirred bioreactors*. Cytotech. **1**, 319-329, 1988.
- Jaiswal, N., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I., Bruder, S.P.: *Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro*. J. Cell. Biochem. **64**, 295-312, 1997.
- Jimenez, S.A., Harsch, M., Rosenbloom, J.: *Hydroxyproline stabilizes the triple helix of chick tendon collagen*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **52**, 106-114, 1973.
- Johnstone, B., Hering, T.M., Caplan, A.I., Goldberg, V.M., Yoo, J.U.: *In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells*. Exp. Cell Res. **238**(1), 265-72, 1998.

- Juliano, R.L., Haskill, S.: *Signal transduction from the extracellular matrix*. J. Cell Biol. **120**, 577-585, 1993.
- Kadiyala, S., Jaiswal, N., Bruder, S.P.: *Culture expanded, bone-marrow derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical-sized segmental bone defect*. Tissue Eng. **3**(2), 173-185, 1997.
- Kim, B.J., Seo, J.H., Bubien, J.K., Oh, Y.S.: *Differentiation of adult bone marrow stem cells into neuroprogenitor cells in vitro*. Neuroreport **13**(9), 1185-1188, 2002.
- Komarova, S.V., Ataullakhanov, F.I., Globus, R.K.: *Bioenergetics and mitochondrial transmembrane potential during differentiation of cultured osteoblasts*. Am. J. Cell Physiol. **279**(4), C1220-1229, 2000.
- Kon, E., Muraglia, A., Corsi, A., Bianco, P., Marcacci, M., Martin, I., Boyde, A., Ruspantini, I., Chistolini, P., Rocca, M., Giardino, R., Cancedda, R., Quarto, R.: *Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones*. J. Biomed. Mater. Res. **49**, 328-337, 2000.
- Kopen, G.C., Prockop, D.J., Phinney, D.G.: *Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**(19), 10711-10716, 1999.
- Lauber, J.: *Genetische Charakterisierung der östrogenabhängigen Entwicklung von Knochenmarkstromazellen der Ratte in vitro*. Dissertation, Cuvillier Verlag, Göttingen, TU Braunschweig, 1998.
- Laurencin, C.T. and Lu, H.H.: *Polymer-Ceramic Composites for Bone-Tissue Engineering*. in: Davies, J.E., Bone engineering, em squ. inc., Toronto, 462-472, 1999.
- Lietchy, K.W., MacKenzie, T.C., Shaaban, A.F., Radu, A., Moseley, A.M., Deans, R., Marshak, D.R., Flake, A.W.: *Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep*. Nat. Med. **6**(11), 1282-1286, 2000.
- MacGregor, G.R., Zambrowicz, B.P., Soriano, P.: *Tissue non-specific alkaline phosphatase is expressed in both embryonic and extra-embryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells*. Development **121**, 1487-1496, 1995.
- Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S., Konishi, F., Kodama, H., Pan, J., Sano, M., Takahashi, T., Hori, S., Abe, H., Hata, J., Umezawa, A., Ogawa, S.: *Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro*. J. Clin. Invest. **103**, 697-705, 1999.
- Malaval, L., Modrowski, D., Gupta, A.K., Aubin, J.E.: *Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures*. J. Cell. Physiol. **158**(3), 555-72, 1994.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.: *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Maniopoulos, C., Sodek, J., Melcher, A.H.: *Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats*. Cell Tissue Res. **254**, 317-330, 1988.
- Manolagas, S.C.: *Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis*. Endocr. Rev. **21**, 115-137, 2000.
- Mareshi, K., Biasin, E., Piacibello, W., Aglietta, M., Madon, E., Fagioli, F.: *Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood*. Haematologica **86**(10), 1099-1100, 2001.
- Marks, S.C. and Hermey, D.C.: *The Structure and Development of Bone*. In Bilezikian, J.P., Raisz, L.G., Rodan, G.A. eds.: Principles of Bone Biology, New York, Academic Press, 3-14, 1996.
- Meyer, U., Terodde, M., Joos, U., Wiesmann, H.P.: *Mechanische Stimulation von Osteoblasten in der Zellkultur*. Mund Kiefer Gesichtschir. **5**(3), 166-172, 2001.

- Middleton, J., Arnott, N., Walsh, S., Beresford, J.: *Osteoblasts and osteoclasts in adult human osteophyte tissue express the mRNAs for insulin-like growth factors I and II and the type I IGF-Receptor*. Bone **16**, 287-293, 1995.
- Mueller, S.M., Gerstenfeld L.C., Mizuno, S., Glowacki, J.: *Medium perfusion enhances osteogenesis by murine osteosarcoma cells in three-dimensional collagen sponges*. J. Bone Miner. Res. **14**, 2118-2127, 1999.
- Müller, S.M. and Glowacki, J.: *Construction and regulation of 3-dimensional bone tissue in vitro*. In Davies, J.E. (ed.): Bone engineering, em squ. inc., Toronto, 473-487, 1999.
- Mundy, G.R., Chen, D., Zhao, M., Dallas, S., Xu, C., Harris, S.: *Growth regulatory factors and bone*. Rev. Endocr. Metab. Disord. **2**, 105-115, 2001.
- Nakamura, T., Hanada, K., Tamura, M., Shibunushi, T., Nigi, H., Tagawa, M., Fukumoto, S., Matsumoto, T.: *Stimulation of endosteal bone formation by systemic injections of recombinant basic fibroblast growth factor in rats*. Endocrinology **136**, 1276-1284, 1994.
- Nicolas, V., Prewett, A., Bettica, P., Mohan, S., Finkelmann, R.D., Baylink, D.J., Farley, J.R.: *Age-related decrease in insulin-like growth factor-I and transforming growth factor  $\beta$  in femoral cortical bone from both men and women: implications for bone loss with aging*. J. Clin. Endocrinol. Metab. **78**, 1011-1016, 1994.
- Norman, A.W., Collins, E.D.: *Vitamin D Receptor Structure, Expression, and Nongenomic Effects*. In Bilezikian, J.P., Raisz, L.G., Rodan, G.A. (eds.): Principles of Bone Biology, Acad. Press, New York, 419-434, 1996.
- Oldberg, A., Franzén, A., Heinegard, D., Pierschbacher, M., Ruoslahti, E.: *Identification of a Bone sialoprotein (BSP) receptor in osteosarcoma cells*. J. Biol. Chem. **263**, 19433-19435, 1988.
- Oldberg, A., Franzén, A., Heinegard, D.: *Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an RGD-cell-binding sequence*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 8819-8823, 1986.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S.M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D.M., Leri, A., Anversa, P.: *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium*. Nature **401**, 701-705, 2001.
- Owen, M.E., Cave, J., Joyner, C.J.: *Clonal analysis in vitro of osteogenic differentiation of marrow CFU-F*. J. Cell Sci. **87**(Pt 5), 731-738, 1987.
- Owen, T., Aronow, M., Shalhoub, V., Barone, L. M., Wilming, L., Tassinari, M. S., Kennedy, M. B., Pockwinse, S., Lian, J. B., Stein, G. S.: *Progressive development of the Rat osteoblast phenotype in vitro: Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix*; J. Cell. Physiol. **143**, 420-430, 1990.
- Peter, S.J., Liang, C.R., Kim, D.J., Widmer, M.S., Mikos, A.G.: *Osteoblastic phenotype of rat marrow stromal cells cultured in the presence of dexamethasone, beta-glycerolphosphate, and L-ascorbic acid*. J. Cell Biochem. **71**(1), 55-62, 1998.
- Peterkowsky, B., Haralson, M.A., Dimari, S.J., Miller, E.J.: *Types I,III and V collagen and total collagen from cultured cells and tissues*. In Haralson, M.A. and Hassel, J.R. (eds.): Extracellular Matrix – A Practical Approach. Oxford University Press, 156-163, 1995.
- Petite, H., Viateau, V., Bensaid, W., Meunier, A., dePollak, C., Bouruignon, M., Oudina, K., Sedel, L., Guillemain, G. : *Tissue-engineered bone regeneration*. Nature Biotechnol. **18**, 959-963, 2000.
- Pfeilschifter, J., Seyedin, S.M., Mundy, G.R.: *Transforming growth factor beta inhibits bone resorption in fetal rat long bone cultures*. J. Clin. Invest. **82**, 680-685, 1988.

- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R.: *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, **284**, 141-147, 1999.
- Platzer, W.: *Taschenatlas der Anatomie – Band 1 Bewegungsapparat*, 7. Aufl., Stuttgart, Thieme, 20-28, 1999.
- Price, P.A. and Baukol, S.A.: *1,25 Dihydroxyvitamin D3 increases synthesis of the vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells*. J. Biol. Chem. **255**, 11660-11663, 1980.
- Price, P.A.; Otsuka, A.S.; Poser, J.W.; Kristaponis, J.; Raman, N.: *Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid containing protein from bone*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 1447-51, 1976.
- Pri-Chen, S., Pitaru, S., Lokiec, F., Savion, N.: *Basic fibroblast growth factor enhances the growth and expression of the osteogenic phenotype of dexamethasone-treated human bone marrow-derived bone-like cells in culture*. Bone **23**(2), 111-117, 1998.
- Prockop, D.J.: *Marrow stromal cells as stem cells for non-haematopoietic tissues*. Science, **276**, 71-74, 1997.
- Puzas, J.E.: *Osteoblast Cell Biology – Lineage and Function*. In Favus, M.J., Goldring, S.R., Hendy, G.N., Holick, M.F., Kaplan, F., Khosla, S., Kleerekoper, M., Langman, C.B., Lian, J.B., Shane, E., Shoback, D.M., Stewart, A.F., Whyte, M.P., Christakos, S. (eds.), Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, Lippincott-Raven, Philadelphia, New York, 1996.
- Quarles, L.D., Yohay, D.A., Lever, L.W., Caton, C., Wenshup, R.J.: *Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: An in vitro model of osteoblast development*. J. Bone Miner. Res. **7**, 683-692, 1992.
- Raines, E.W., Lane, T.W., Iruela-Arispe, M.L., Ross, R., Sage, E.H.: *The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet derived growth factor (PDGF)-AB and –BB and inhibits the binding of PDGF to its receptors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**, 1281-1285, 1992.
- Reitzer, L. J., Wice, M. B., Kennell, D.: *Evidence that glutamine, not sugar, is the major source for cultured HeLa cells*. J. Biol. Chem. **254**, 2669-2676, 1979
- Reyes, M., Lund, T., Lenvik, T., Aguiar, D., Koodie, L., Verfaillie, C.M.: *Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells*. Blood **98**(9):2615-2625, 2001.
- Rodan, G.A., Heath, J.K., Yoon, K., Noda, M., Rodan, S.B.: *Diversity of the osteoblastic phenotype*. In Evered, D. & Harnett, S. (eds.): Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissue. J. Wiley, Chichester, UK, 78-91, 1988.
- Rodan, G.A.: *The missing bone*. Cell **89**, 677-680, 1997.
- Rydziel, S., Shaikh, S., Canalis, E.: *Platelet-derived growth factor-AA and –BB (PDGF-AA and –BB) enhance the synthesis of PDGF-AA in bone cell cultures*. Endocrinology **134**, 2541-2546, 1994.
- Sandy, J., Davies, M., Prime, S., Farndale, R.: *Signal pathways that transduce growth factor-stimulated mitogenesis in bone cells*. Bone **23**(1), 17-26, 1998.
- Schwartz, M.A., Baron, V.: *Interactions between mitogenic stimuli, or, a thousand and one connections*. Curr. Opin. Cell Biol. **11**(2), 197-202, 1999.
- Sell, S., Gaissmaier, C., Fritz, J., Herr, G., Esenwein, S., Kusswetter, W., Volkmann, R., Wittkowski, K.M., Rodemann, H.P.: *Different behavior of human osteoblast-like cells isolated from normal and heterotopic bone in vitro*. Calcif Tissue Int. **62**, 51-59, 1998.
- Shea, L.D., Wang, D., Francheschi, R.T., Mooney, D.J.: *Engineered bone development from a pre-osteoblast cell line on three-dimensional scaffolds*. Tissue Eng. **6**, 605-616, 2000.

- Shi, S., Gronthos, S., Chen, S., Reddi, A., Counter, C.M., Robey, P.G., Wang, C.Y.: *Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression*. Nature Biotechnol. **20**, 587-591, 2002.
- Shiang, R., Thompson, L.M., Zhu, Y.Z., Church, D.M., Fielder, T.J., Bocian, M., Winokur, S.T., Wasmuth, J.J.: *Mutation in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia*. Cell **78**, 335-342, 1994.
- Simmons, P.J., Torok-Storb, B.: *Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1*. Blood **78**, 55-62, 1991.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C.: *Measurement of Protein using bicinchoninic acid*. Anal. Biochem. **150**, 76-85, 1985.
- Spindler, K.P., Shapiro, D.B., Gross, S.B., Brighton, C.T., Clark, C.C.: *The effect of ascorbic acid on the metabolism of rat calvarial bone cells in vitro*. J. Orthop. Res. **7**, 696-701, 1989.
- Stein, G., Lian, J., Owen, T.: *Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation*. FASEB J. **4**, 3111-3123, 1990.
- Sudo, H., Kodama, H., Amagai, Y., Yamamoto, S., Kasai, S.: *In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria*. J. Cell. Biol. **96**, 191-198, 1984.
- Szekeres J., Pacsa A.S., Pejtsik B.: *Measurement of lymphocyte cytotoxicity by assessing endogenous alkaline phosphatase activity of the target cells*. J. Immunol. Methods **40**(2), 151-154, 1981.
- Temenoff, J.S., Lu, L., Mikos, A.G.: *Bone Tissue Engineering using synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds*. In Davies, J.E. (ed.), Bone engineering, em squ. inc., Toronto, 454-461, 1999.
- Thomson, R.C., Mikos, A.G., Beahm, E., Lemon, J.C., Satterfield, W.C., Aufdemorte, T.B., Miller, M.J.: *Guided tissue fabrication from periosteum using preformed biodegradable polymer scaffolds*. Biomaterials **20**(21), 2007-2018, 1999.
- Thomson R.C., Yaszemski M.J., Powers J.M., Mikos A.G.: *Hydroxyapatite fiber reinforced poly(alpha-hydroxy ester) foams for bone regeneration*. Biomaterials **19**(21), 1935-1943, 1998.
- Vorlop, J.: *Entwicklung eines Membranrührers zur blasenfreien Begasung und Durchmischung von Zellkultureaktoren im Pilotmaßstab*, Dissertation, TU Braunschweig, 1990.
- Wakitani, S., Saito, T., Caplan, A.I.: *Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine*. Muscle Nerve **18**, 1417-1426, 1995.
- Walford, R.L., Gillagher, R., Sjaard, J.R.: *Serolytic typing of human lymphocytes with immune serum obtained after homografting*. Science **141**, 868-870, 1964.
- Wang, E.A., Israel, D.I., Kelly, S., Luxenberg, D.P.: *Bone morphogenetic protein-2 causes comitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells*. Growth Factors **9**, 57-71, 1993.
- West, D.C., Sattar, A., Kumar, S.: *A simplified in situ solubilization procedure for the determination of DNA and cell number in tissue cultured mammalian cells*. Anal. Biochem. **147**, 289-295, 1985.
- Whyte, M.P.: *Hypophosphatasia*. In Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (eds.): The Metabolic Basis of inherited Disease, McGraw Hill, New York, 2843-2856, 1989.
- Wilkes, R.P. and Athanasiou, K.A.: *The intrinsic incompressibility of osteoblast-like cells*. Tissue Eng. **2** (3), 167-181, 1996.



Williams, D.F.: *Perspectives on the Contributions of Biomaterials and Tissue Engineering to Bone Repair, Reconstruction, and Regeneration*. In Davies, J.E. (ed.): Bone engineering, em squ. inc., Toronto, 577-584, 1999.

Woodbury, D., Schwarz, E.J., Prockop, D.J., Black I.B.: *Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons*. J. Neurosci. Res. **61**(4), 364-370, 2000.

Wright, G.J., Wei, X.Q., McDevitt, C.A., Lane, B., and Sokoloff, L.: *Stimulation of matrix formation in rabbit chondrocyte cultures by ascorbate. I. effect of ascorbate analogs and  $\beta$ -aminopropionitrile*. J. Orthop. Res. **6**, 397-407, 1988.

Xiao, G., Wang, D., Benson, M.D., Karsenty, G., Franceschi, R.T.: *Role of the  $\alpha$ 2-integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the *Osf2* transcription factor*. J. Biol. Chem. **273**, 32988-32994, 1998.

Yoneda, T.: *Local Regulators of Bone: Epidermal Growth Factor – Transforming Growth Factor- $\alpha$* . in Bilezikian, J.P., Raisz, L.G., Rodan, G.A. (eds.): Principles of Bone Biology, Acad. Press, New York, 729-738, 1996.

Young, R.G., Butler, D.L., Weber, W., Caplan, A.I., Gordon, S.L., Fink, D.J.: *Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair*. J. Orthop. Res. **16**, 406-413, 1998.

Zielke, H.R., Ozand, P.T., Tilson, J.T.: *Reciprocal regulation of glucose and glutamine utilization by cultured human diploid fibroblasts*. J. Cell. Physiol. **95**, 41-48, 1978.

Zohar, R., Lee, W., Arora, P., Cheifetz, S., McCulloch, C., Sodek, J.: *Single cell analysis of intracellular osteopontin in osteogenic cultures of fetal rat calvarial cells*. J. Cell. Physiol. **170**(1), 88-100, 1997.

Zohar, R., Sodek, J., McCulloch, C.A.G.: *Characterization of Stromal Progenitor Cells Enriched by Flow Cytometry*. Blood **90**, 3471-3481, 1997b.

Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., Hedrick, M.H.: *Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies*. Tissue Eng. **7**, 211-228, 2001.

## 6. Abkürzungen

β-TCP	β-Tricalciumphosphat
1α,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	1α, 25 –Dihydroxy-Vitamin D <sub>3</sub>
A	Adenosin
AGD	L-Ascorbat-2-Phosphat, β-Glycerophosphat, Dexamethason
AP	Alkalische Phosphatase
Arg	Arginin
Asp	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninic Acid
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BGP	Bone Gla Protein
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BSP	Bone Sialoprotein
C	Cytosin
Ca <sup>2+</sup>	Calciumion
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-Propansulfonsäure
cDNA	komplementäre DNA
CFU-F	Colony forming Unit fibroblast
CSD	Critical Sized Defect
D	Asparagin
dATP	2'-Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytosintriphosphat
Dex.	Dexamethason
dGTP	2'-Desoxy-Guanosintriphosphat
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMEM-HG	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium High Glucose
DMEM-LG	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium Low Glucose
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Nucleosidtriphosphat
ds	Doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxy-Thymidintriphosphat
E	Extinktion
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FBS	Fötales bovines Serum
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
G	Guanosin

G	Glycin
g	Gramm
g	Erdbeschleunigungskonstante
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
Gla	$\gamma$ -Carboxyglutaminsäure
Gluc	D-Glucose
Gly	Glycin
HA	Hydroxylapatit
HEPES	N-2-Hydroxyethylenpiperazin-N-Ethansulfonsäure
I.E.	Internationale Einheiten
IGF	Insulin like Growth Factor
IGFBP	Insulin like Growth Factor - Binding Protein
IMDM	Iscove's Modified Dulbeccos Medium
kat	Katal
Koll-I	Kollagen I
Lac.	L-Lactat
LDH	Lactat Dehydrogenase
MEM alpha	Minimum Essential Medium Eagle
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	messenger RNA
MSC	Mesenchymal Stem Cell
mVDR	membrane Vitamin D <sub>3</sub> -Rezeptor
NBT	Nitroblue-Tetrazoliumsalz
NCP	Non-Collagenous-Proteins
nVDR	nuclear Vitamin D <sub>3</sub> -Rezeptor
OC	Osteocalcin
OD	Optische Dichte
ON	Osteonectin
OPN	Osteopontin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
PGA	Polyglycolide Acid
PI	Phosphatidyl-Inositol
PLGA	Poly-L-Lactid-Glycolid Acid
PLLA	Poly-L-Lactid Acid
PMMA	Polymethylmethacrylat
R	Arginin
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rh	rekombinant human
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RNAsin	Ribonuklease Inhibitor
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SEM	Scanning Electron Microscopy
SPARC	Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein
ss	einzelsträngig

---

Strep	Streptomycin
T	Thymidin
TAE	Tris Acetat EDTA
Taq	Thermus aquaticus
tct	tissue culture treated
TE	Tris/EDTA Puffer
TEP	Trypsin-EDTA-PBS Lösung
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor beta
U	Units
UPM	Umdrehungen pro Minute

Zusätzlich wurden in der vorliegenden Arbeit die gängigen Abkürzungen benutzt, die auch in einer Vielzahl von Lehrbüchern verwendet werden.